

**Aus der Abteilung für Endokrinologie
der
II. Medizinischen Klinik
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leiter: Prof. Dr. J. Beyer)**

Untersuchungen zum Einfluß von LHRH auf die Epiphysenfunktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von
Daniela Diehl
aus Berlin

Mainz, 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Aus der Abteilung für Endokrinologie
der
II. Medizinischen Klinik
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leiter: Prof. Dr. J. Beyer)**

Untersuchungen zum Einfluß von LHRH auf die Epiphysenfunktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von
Daniela Diehl
aus Berlin

Mainz, 1986

Dekan: Professor Dr. med. J. Michaelis
1. Gutachter: Professor Dr. med. J. Happ
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. phil. nat. U. Krause

Tag der Promotion: 14. Oktober 1986

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung	6
1.	Geschichtlicher Überblick	6
2.	Embryologische Entwicklung und Anatomie der Epiphyse	7
2.1	<i>Embryologie</i>	7
2.2	<i>Anatomie und Histologie</i>	7
2.3	<i>Innervation</i>	7
2.4	<i>Kalzifikation</i>	8
3.	Physiologie der Melatoninsekretion	8
3.1	<i>Biosynthese</i>	8
3.2	<i>Sekretion</i>	10
3.3	<i>Transport zu den Zielorganen</i>	10
3.4	<i>Metabolismus</i>	10
4.	Physiologie des Melatonins beim Tier	11
4.1	<i>Regulation der Melatoninsekretion</i>	11
4.1.1	<i>Pinealocyten als neuroendokrine Schaltstelle</i>	11
4.1.2	<i>Optische Kontrolle der Epiphysenfunktion</i>	11
4.1.3	<i>Kontrolle der Epiphysenfunktion durch das sympathische Nervensystem unter besonderer Berücksichtigung des Streß</i>	13
4.1.4	<i>Einfluß der Oestrogene und verwandten Steroidhormone auf die Epiphysenfunktion</i>	14
4.2	<i>Wirkungen von Melatonin auf verschiedene Zielorgane</i>	15
4.2.1	<i>Hypothalamo-hypophyso-gonadale Achse</i>	15
4.2.2	<i>Schilddrüse</i>	17
4.2.3	<i>Nebenschilddrüse</i>	17
4.2.4	<i>Nebennierenrinde</i>	17
5.	Regulation der Melatoninsekretion im menschlichen Organismus	18
5.1	<i>Tagesrhythmik, Lichtbedingungen, Schlaf und Schlafentzug, Ortswechsel</i>	18
5.2	<i>Sympathisches Nervensystem mit Berücksichtigung des Streß</i>	20
5.3	<i>Altersabhängigkeit der Melatoninsekretion</i>	21
5.4	<i>Einfluß der Gonadenfunktion auf die Melatoninsekretion - Zyklusabhängigkeit</i>	21
5.5	<i>Cortisol, Prolactin und Melatonin</i>	22
6.	Melatonineffekte beim Menschen	23

7.	Melatoninsekretion bei verschiedenen Erkrankungen	23
7.1	<i>Epiphysentumoren</i>	23
7.2	<i>Hypophyseninsuffizienz</i>	26
7.3	<i>Primärer Hypogonadismus</i>	26
7.4	<i>Nebennierenrinden-Funktionsstörungen</i>	26
7.5	<i>Psychiatrische Erkrankungen</i>	27
8.	Methoden der Melatoninbestimmung	27
	- Indirekter Hydroxy-Indol-O-Methyltransferase-Assay	27
	- Bioassay, Radioimmunosassay, Gaschromatographie und Massenspektrometrie	27
II.	Fragestellung	29
III.	Methodik	30
IV.	Bestimmungsmethode	31
1.	Allgemeine Prinzipien radioimmunologischer Techniken	31
2.	Qualitätskontrollen beim Radioimmunoassay	32
3.	Radioimmunologische Bestimmung von Melatonin nach Wetterberg et al. mit dem KABI-Kit	38
3.1	<i>Erforderliche Reagenzien, Herstellung der Lösungen; Geräte</i>	38
3.2	<i>Extraktion</i>	41
3.3	<i>Radioimmunoassay</i>	41
3.4	<i>Qualitätskontrolle</i>	43
4.	Modifikationen der Melatoninbestimmung nach Wetterberg et al.	45
4.1	<i>Herstellung der Lösungen, Reagenzien</i>	45
4.2	<i>Extraktion</i>	46
4.2.1	<i>Extraktion nach Arendt</i>	46
4.2.2	<i>Extraktion teils nach Arendt, teils nach Wetterberg</i>	48
4.3	<i>Modifikationen der radioimmunologischen Bestimmung</i>	52
4.3.1	<i>Inkubationskinetik</i>	52
4.3.2	<i>Trennungsv erfahren</i>	55
4.3.2.1	<i>Nachwaschen mit Ammoniumsulfat</i>	55
4.3.2.2	<i>Doppelantikörper</i>	56
4.3.2.3	<i>Aktivkohle</i>	59
4.3.3	<i>Arendt-Antikörper</i>	59
4.3.3.1	<i>Spezifische Bindung B_0</i>	59
4.3.3.2	<i>Melatoninstandardkurve und Serumproben</i>	62
5.	Haltbarkeitsversuche	66

Inhaltsverzeichnis	Seite
V. Untersuchungen an Probanden	67
1. Versuchsaufbau	67
2. Beschreibung der verwendeten Pharmaka	67
3. Probanden	68
VI. Ergebnisse	69
1. Ergebnisse der Untersuchungen zur Optimierung der radioimmunologischen Bestimmungsmethode	69
2. Klinische Ergebnisse	70
2.1 <i>Melatoninkonzentrationsprofil ohne pharmakologische Einflüsse</i>	76
2.2 <i>Schlafmittelgabe</i>	77
2.3 <i>LHRH-Belastungstest</i>	77
VII. Diskussion	78
VIII. Zusammenfassung	83
IX. Literaturverzeichnis	85
X. Anhang	93
1. Tabellen	93
2. Beschreibung der Probanden	106
3. Verzeichnis der Abkürzungen	108

I. EINLEITUNG

1. Geschichtlicher Überblick

Zwischen 1959 und 1964 begann für die Erforschung der Epiphyse, die auch Corpus pineale oder Zirbeldrüse genannt wird, das „Goldene Zeitalter“.

Vor dieser Zeit wurde die Epiphyse in Lehrbüchern der Physiologie und Endokrinologie nach Descartes als „Sitz der Seele“ und folglich als „Sitz der Rationalität“ angesehen, als Verbindungsstelle des vergänglichen Körpers mit der unsterblichen Seele, weshalb die Epiphyse ihre besondere Bedeutung für die Psychiatrie der damaligen Zeit erlangte (37).

Durch die Forschung von McCord und Allen war seit 1917 bekannt, daß sich die Haut von Fröschen und Kaulquappen sehr schnell aufhellt, wenn diese Tiere mit Rinderepiphysenextrakten gefüttert wurden (15). Vierzig Jahre später identifizierten Lerner und seine Mitarbeiter (29) diesen „hautaufhellenden Faktor bei Amphibien“ als Melatonin (N-Acetyl-5-Methoxytryptamin), der eine perinukleäre Aggregation von Pigmentgranula in den Melanocyten bewirkt (75). Dieser Effekt steht im Gegensatz zu der Wirkung von MSH (Melanocyten stimulierendes Hormon), das von der Pars intermedia der Hypophyse freigesetzt wird (71). Melatonin hat jedoch beim Menschen offensichtlich keinen Einfluß auf die Melanocyten, die für die Pigmentation der menschlichen Haut verantwortlich sind.

Damals besaß das Corpus pineale die Bedeutung des „Dritten Auges“ der niederen Vertebraten – nicht jedoch der Säugetiere – und ganz allgemein einer kalzifizierten Spur als Orientierungshilfe für die Neuroradiologen.

Nicht allein die mißverständene Abwertung der menschlichen Epiphyse als einen verkümmerten Überrest der Evolution begründete diese Ignoranz, sondern auch die großen Probleme, die die Messungen der Epiphysensekretionsprodukte mit sich brachten (37).

Vor zwanzig Jahren wurde dann von Wissenschaftlern aus verschiedenen biomedizinischen Disziplinen eine Theorie der Epiphysenfunktion, die sogenannte „Melatonin-Hypothese“ begründet, die 1965 von Wurtman und Axelrod veröffentlicht wurde (75). Sie beschreibt, daß die Säugetierepiphyse Melatonin in einem zu den umgebenden Lichtbedingungen umgekehrt proportionalen Verhältnis synthetisiert und sezerniert und daß die Epiphyse Informationen über das Licht auf einem Weg empfängt, der die Retina, die afferenten und efferenten Neurone des Ganglion cervicale superius einschließt (10).

Lerner und seine Mitarbeiter (29) beschrieben die chemische Struktur des Melatonins und identifizieren es als den Bestandteil des Rinderepiphysenextraktes, von dem man vierzig Jahre vorher fand, daß er die Froschhaut aufhellt (Abb. 1).

2. Embryologische Entwicklung und Anatomie der Epiphyse

2.1 Embryologie

Bei allen Wirbeltieren entsteht die Epiphyse (Zirbeldrüse) aus dem Dach des Diencephalon als eine neuroepitheliale Ausstülpung. Da sie sich auf dem Zwischenhirndach nach dorsal entwickelte, wird die Zirbeldrüse als *Epiphysis cerebri* bezeichnet (60). Beim Menschen tritt diese Epiphysenanlage zu Beginn des zweiten Fetalmonats auf (75).

2.2 Anatomie und Histologie

Das Corpus pineale des erwachsenen Menschen stellt einen länglichen, abgeplatteten, an einen Pinienzapfen erinnernden Körper dar. Er ist mit zwei Zügeln, den *Habenulae*, die zu einem dreieckigen Feld, dem *Trigonum habenulare*, ziehen, befestigt. Die Epiphyse ruht auf der Vierhügelplatte, der *Lamina tecti quadrigemina*, zwischen ihren beiden *Colliculi superiores*, unterhalb des hinteren Randes des *Corpus callosum*, *Splenium corporis callosi* (60).

Die Epiphyse wiegt durchschnittlich ungefähr 120 mg mit einer großen Schwankungsbreite von 41 bis 804 mg (62). Sie wird größtenteils von *Pia mater* umgeben, von welcher Blutgefäße, unmyelinisierte Nervenfasern und Bindegewebsstroma das Corpus pineale penetrieren (75). Die Epiphyse wird von einem sehr gut ausgebildeten Gefäßsystem vaskularisiert. Der Anteil des Herzschlagvolumens, der die Epiphyse erreicht, ist mit am größten im gesamten Organismus. Diese extrem reiche vaskuläre Zufuhr ist ein Gegenbeweis zu der Hypothese, daß die Säugetierepiphyse lediglich ein verkümmertes Organ sei.

Der Pinealocyt stellt die charakteristische Parenchymzelle der Säugetierepiphyse dar. Er stammt von der neuroepithelialen Matrixschicht ab und ist nicht mehr mit den epiphysären Photorezeptorzellen der meisten niederen Vertebraten gleichzusetzen. Die Photorezeptorzellen enthalten nämlich charakteristische subzelluläre Organellen, sogenannte „Außensegmente“, und Lamellenkörper, die die zelluläre Antwort auf Licht übermitteln (75).

Zusätzlich zu den Pinealocyten enthält die Epiphyse auch modifizierte Neurogliazellen mit Gliafasergerüst (75). Zahlreiche Pinealocytenfortsätze endigen im perivaskulären Raum der Kapillaren. Die Epiphyse selbst ist von Cerebrospinalflüssigkeit umgeben (75).

2.3 Innervation

Die Säugetierepiphyse wird fast ausschließlich von sympathischen, postganglionären Nervenfasern innerviert, die aus dem Ganglion cervicale superius hervorgehen. Dies stellt eine beachtenswerte Eigenheit für ein Organ dar, welches zumindest embryologisch ein Anteil des Gehirns ist. Diese für die Epiphyse ungewöhnliche sympathische

Innervation wurde 1961 von Kappers entdeckt (24). Die postganglionären, sympathischen Fasern erreichen die Epiphyse entlang von Blutgefäßen oder durch Zusammenwachsen von zwei unmyelinisierten Nerven, den Nn. conarii, die den distalen Pol des Organs penetrieren. Die sympathischen Fasern endigen in der Nähe des Pinealocyten. Einige bilden Synapsen mit einem Synapsenspalt von 40 nm, der für alle sympathischen Nerven charakteristisch ist. Chemische und fluoreszenz-mikroskopische Studien haben das Vorkommen von Noradrenalin und Serotonin in der Zirbeldrüse bestätigt. Noradrenalin ist jedoch nur auf die sympathischen Nervenendigungen begrenzt, während sich Serotonin sowohl im Pinealocyten als auch in den Nervenendigungen befindet (75).

2.4 Kalzifikation

Eine andere Eigenheit der menschlichen Epiphyse stellt ihre Verkalkungstendenz dar. Bald nach der Geburt beginnen die Pinealocyten des Menschen eine Grundsubstanz von unbekannter chemischer Zusammensetzung zu produzieren und zu sezernieren, die als Matrix für die darauffolgende Kalzifizierung dient. Die Zusammensetzung der abgelagerten Calciumsalze – zum größten Teil Calciumhydroxyapatit – unterscheidet sich nicht von denjenigen der Zähne und Knochen (75). Post mortem durchgeführte Untersuchungen an menschlichen Epiphysen zeigten, daß das Corpus pineale eine aktive Drüse während des gesamten Lebens darstellt. Insbesondere bleiben die histologisch bewertete Vollständigkeit der sekretorischen Zellen und die Enzymaktivitäten innerhalb der Drüse vom Grad der Kalzifikation unberührt und ändern sich nicht mit zunehmendem Alter (37). Die funktionelle Bedeutung der Verkalkung bleibt jedoch noch vollkommen ungeklärt. Da eine röntgenologisch nachweisbare Verkalkung während des ersten Lebensjahrzehnts ungewöhnlich ist, sollte die Verkalkung des Corpus pineale in dem genannten Lebensalter einen Epiphysentumor vermuten lassen (75).

3. Physiologie der Melatoninsekretion

3.1 Biosynthese

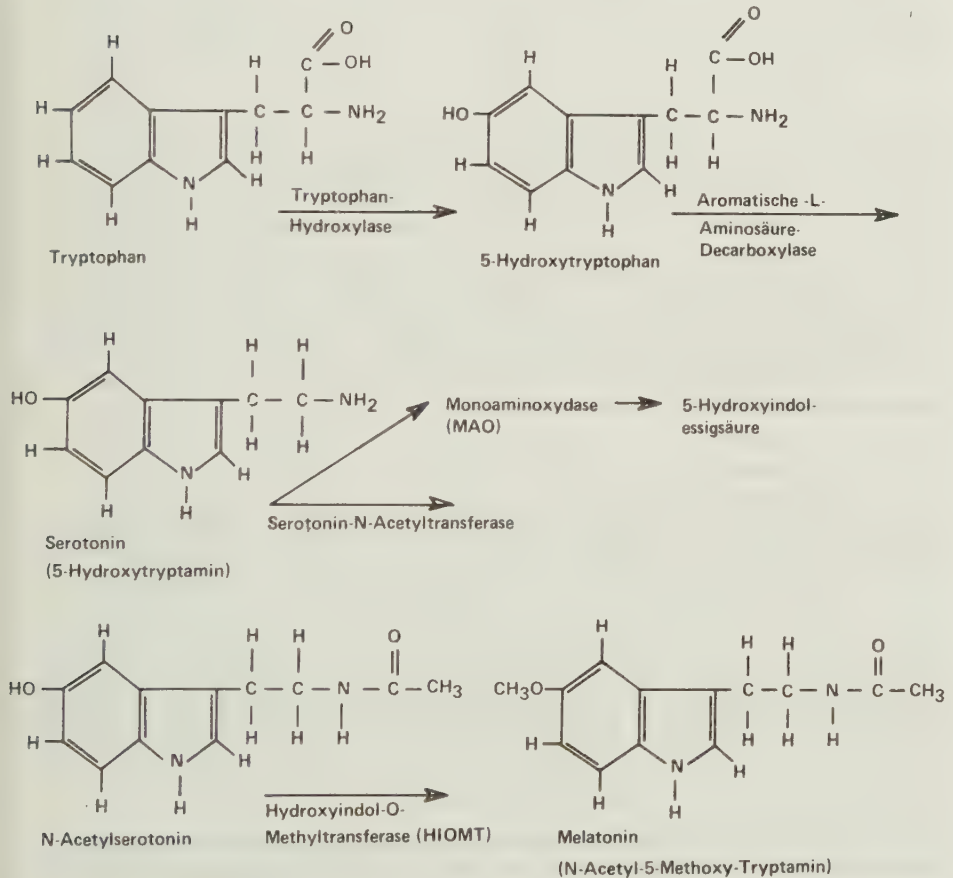
Melatonin unterscheidet sich von allen vorher in Säugetieren identifizierten Indolen insofern, als es eine Methoxyseitenkette besitzt (75).

Die Melatonsynthese nimmt ihren Anfang mit der Aufnahme der essentiellen Aminosäure Tryptophan durch die Pinealocyten (10), (Abb. 1). Innerhalb der Pinealocyten wird ein Teil des Tryptophans für die Proteinsynthese verwendet, während eine weitaus größere Fraktion den Indolbiosyntheseweg einschlägt.

Der erste Syntheseschritt beinhaltet die Oxidation des Tryptophans in der 5-Position zu 5-Hydroxytryptophan (Enzym: Tryptophan-Hydroxylase). 5-Hydroxytryptophan wird daraufhin decarboxyliert zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin) durch das Enzym: aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase. Mehr als 90 % des außerhalb der Epiphyse gebildeten Serotonins wird durch die Monoaminoxidase (MAO) in einem

Desaminisierungsschritt zu 5-Hydroxyindolessigsäure abgebaut. Die Monoaminoxidase befindet sich auch in der Epiphyse und baut einen Teil des Serotonins ab. Ein viel größerer Anteil des Serotonins wird in der Epiphyse zu Melatonin umgebildet, was eine Zweischrittreaktion erfordert: Zuerst wird Serotonin zu N-Acetylserotonin acetyliert (Enzym: N-Acetyltransferase). Dann wird eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die 5-Hydroxygruppe des N-Acetylserotonins übertragen und Melatonin gebildet (N-Acetyl-5-Methoxytryptamin). Diese Reaktion wird durch das Enzym Hydroxy-Indol-O-Methyltransferase (HIOMT) katalysiert. Beide Enzyme - N-Acetyltransferase und HIOMT - bestimmen die Syntheserate des Melatonins. HIOMT ist bei Säugetieren nicht nur in der Epiphyse beschrieben worden sondern auch in der Retina (75).

Abbildung 1: „Die Biosynthese des Melatonins in der Epiphyse“ nach Wurtmann, Cardinali (75)



3.2 *Sekretion*

Die quantitativen und zeitlichen Beziehungen zwischen der Melatoninsynthese und der -sekretion sind noch ungeklärt. Man vermutet, daß Melatonin nicht sofort sezerniert wird, sondern daß die Freisetzung aus einer passiven Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten resultiert, wie diejenige der Glucocorticoide aus der Nebennierenrinde (77). Noradrenalin wirkt nur insofern, als es die Melatoninsynthese stimuliert. Der darauffolgende Konzentrationsanstieg von Melatonin in der Epiphyse verursacht, daß entsprechend mehr Hormon aus der Epiphyse diffundiert (77).

Eine genaue Kenntnis des primären Sekretionsortes existiert bisher nicht (78): Auf der einen Seite fanden Wurtman et al. (78, 71) sowie Wetterberg (62) bei Menschen und Kälbern höhere Melatoninkonzentrationen in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) als im Serum, weshalb sie die CSF für den primären Sekretionsort hielten. Auf der anderen Seite ermittelten Arendt et al. (6) höhere Melatoninwerte im Serum als in der CSF, und Pang und Ralph (43) zeigten an einem Experiment am Huhn, daß Melatonin primär in den Blutstrom freigesetzt wird.

3.3 *Transport zu den Zielorganen*

Melatonin ist wie die meisten Indole an Serumalbumin gebunden (11). Es ist daher lipidlöslich und in unpolaren Lösungsmitteln – wie z. B. Dichlormethan – löslich. Das zirkulierende Melatonin wird von allen Organen aufgenommen (77); es konzentriert sich vor allem in den Gonaden (75); jedoch beruhen fast alle bekannten Melatonin-Effekte auf Auswirkungen auf das Gehirn (77). Das Methoxyindol passiert leicht die Blut-Hirn-Schranke im Gegensatz zu Serotonin, welches bei einem physiologischen pH-Wert polar ist (75). Isotopen-markiertes, in die CSF injiziertes Melatonin wird gleichmäßig innerhalb des Gehirns aufgenommen; es konzentriert sich im Hypothalamus und Mittelhirn (75).

3.4 *Metabolismus*

Das Isotopen-markierte Melatonin verschwindet schnell aus dem Gehirn und Blutstrom. Obwohl das Zentrale Nervensystem (ZNS) selbst – über noch nicht definierte Wege – Melatonin metabolisiert, scheint die Leber der wichtigste Ort der Melatonininaktivierung zu sein (75). Melatonin wird zuerst hydroxyliert zu 6-Hydroxymelatonin durch ein mikrosomales, NADPH erforderndes Enzym. Das Ausmaß, in dem die Leber Melatonin metabolisiert, variiert insofern, als das mikrosomale, 6-hydroxylierende Enzym des Säugetiers im Rattenexperiment durch Phenothiazin gehemmt wird und durch eine Vielzahl von Pharmaka, z. B. Chlorpromazin, induziert wird (42). Dieses hydroxylierte Produkt wird mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure konjugiert und über die Nieren ausgeschieden.

Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, daß 20-25 % der normalen Melatoninurinkonzentration auch im Harn pinealektomierter Ratten vorhanden sind (44).

Die Quelle dieses extrapineal gebildeten Melatonins ist bisher nicht sicher zu identifizieren – möglicherweise entstammt es den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms (44) oder Organen, die Melatonin oder mehrere Enzyme der Melatoninsynthese enthalten – z. B. der Retina oder der Harder'schen Drüse (59).

4. Physiologie des Melatonins beim Tier

4.1 Regulation der Melatoninsekretion

4.1.1 Pinealocyten als neuro-endokrine Schaltstelle

Die Kommunikation zwischen Organen erfolgt unter anderem auf dem Wege von Neuronen über ihre Transmitter zu den endokrinen Zellen (75). Die Epiphyse der Säugetiere stellt eine neuroglanduläre Schaltstelle dar. Sie verwandelt einen neuronalen Impuls, der durch den in den Synapsenspalt entlassenen Neurotransmitter gebildet wird, in eine endokrine Antwort, nämlich die Sekretion von Melatonin. Andere Beispiele für neuroglanduläre Verbindungen betreffen die adrenomedullären, chromaffinen Zellen, welche Adrenalin als Antwort auf Acetylcholin sezernieren, außerdem die Renin-sezernierenden juxtaglomerulären Zellen der Nieren, die Vasopressin-produzierenden Zellen des Nucleus supraopticus hypothalamicus und die B-Zellen der Pankreasinseln. Alle diese Zellen reagieren sowohl auf humorale als auch auf neuronale Impulse. Ihre Einzigartigkeit besteht jedoch in ihrer Fähigkeit, eine „Nervensprache“ in eine „Hormonsprache“ zu übersetzen.

Um zu beweisen, daß der Pinealocyt als neuroendokrine Schaltstelle wirkt, muß eine direkte Innervation der Zelle nachgewiesen werden; weiterhin die beeinträchtigte Fähigkeit des Pinealocyten, entsprechende Hormonmengen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu sezernieren, wenn diese Innervation unterbrochen wird.

Die Endigungen der postganglionären sympathischen Neuronen, deren Zellkörper außerhalb der kranialen Kavität im Ganglion cervicale superius gelegen sind, konnten in der Nachbarschaft des Pinealocyten identifiziert werden. Manche bilden richtige Synapsen mit einem Synapsenspalt von 40 nm, der für alle sympathischen Neurone charakteristisch ist (75). Die funktionale Aktivität, nämlich Melatonin als Antwort auf Lichtbedingungen und Tageszeiten zu produzieren, wird im Tierexperiment durch die Entfernung der sympathischen Innervation zerstört (75).

Die Tatsache, daß die Epiphyse eine neuroendokrine Verbindung darstellt, läßt verstehen, daß sie im Tierexperiment nach Transplantation und Wiederherstellung der Zirkulation – im Gegensatz zur Schilddrüse und der Nebennierenrinde – ihre Funktion nicht wieder aufnehmen kann (75).

4.1.2 Optische Kontrolle der Epiphysenfunktion

Werden Ratten im Experiment einer kontinuierlichen Beleuchtung ausgesetzt, so nimmt die elektrische Aktivität der Epiphyse ab (55). Gleichzeitig verringern sich die

NoradrenalinKonzentration der Epiphyse (73), die Aktivität der pinealen HIOMT (69), der Serotonin-N-Acetyltransferase (26) und der Melatoningehalt der Epiphyse (19, 57, 46).

Der normale Zyklus der Lichtverhältnisse, dem die meisten Tiere ausgesetzt sind, verursacht einen parallelen Rhythmus der synthetischen und metabolischen Epiphysenfunktionen.

Diese schließen folgende Faktoren ein: HIOMT, Serotonin-N-Acetyltransferase, Melatoningehalt der Epiphyse, RNA- und Proteingehalt der Epiphyse, Noradrenalin und Serotonin, Catecholamin-O-Methyltransferase, Adenylcyclase und cyclo-AMP-Gehalt der Epiphyse (10). Dabei entfaltet die Melatoninkonzentration bei Tieren im Blut einen charakteristischen 24-Stunden-Rhythmus mit einem Konzentrationsgipfel während der Nacht um ca. 2.00 Uhr (37).

Scheinbar ist es die Hauptfunktion der Epiphyse, ein Signal auszusenden, dessen Amplitude von der Tageszeit und den umgebenden Lichtbedingungen abhängt. Dieses Signal steht dann dem Gehirn und den anderen Körperorganen zur Verfügung und kann die Tagesrhythmen der biologischen Funktionen erzeugen und synchronisieren (70, 12). In Tierexperimenten an der Albinoratte (77), Schafen und Hamstern (49) erhöht das Fehlen des Lichtreizes, also ständige Dunkelheit, die Aktivität der postganglionären sympathischen Neurone der Epiphyse. Im Gegensatz dazu erniedrigt das konstante Licht die elektrischen Impulse, die die Epiphyse über die sympathischen Nerven erreichen, und in gleichem Maße den Noradrenalingehalt, folglich die Enzymaktivitäten und den Melatoningehalt der Epiphyse. Das Ausmaß dieser Erniedrigung hängt von der spektralen Zusammensetzung der Lichtquelle ab. Das Aktionsspektrum für die photische Hemmung der HIOMT-Aktivität gleicht dem Absorptionsspektrum für das retinale Rhodopsin; so ist gelb-grünes Licht sehr effektiv, während Rot und Ultraviolett wirkungslos sind (10, 77). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß ein und dasselbe Photopigment die visuellen und neuroendokrinen Wirkungen des Lichtes bei Säugetieren vermittelt.

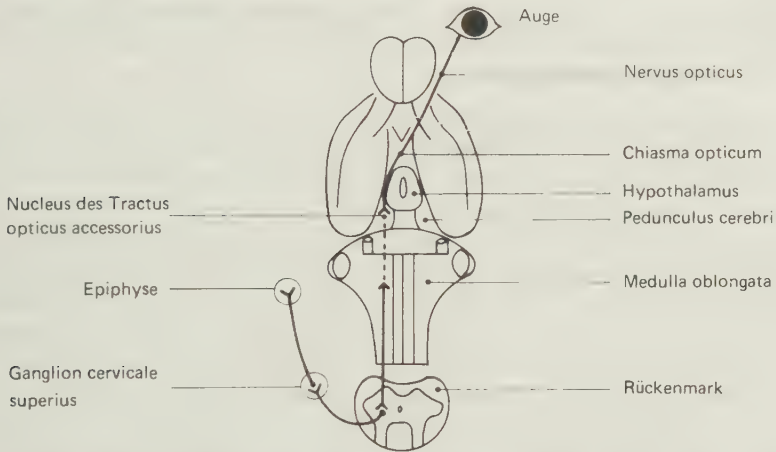
Experimente an Ratten zeigen bei ständiger Dunkelheit oder Erblindung einen erhaltenen Melatoninrhythmus. Die Quelle dieses zyklischen Signals, das die Epiphysenrhythmizität beibehält, ist als eine „Uhr“, eine endogene Oszillation, vorstellbar, die anstelle der Hell-Dunkel-Verhältnisse durch zyklische Aktivitäten des sympathischen Nervensystems und damit einhergehend durch motorische Aktivität oder Nahrungsaufnahme mit darauffolgender Insulinsekretion ersetzt wird (77).

Entsteht ein plötzlicher Wechsel im Hell-Dunkel-Tagesablauf, so stellt sich – nach einer Verzögerungszeit – im Tierexperiment der circadiane Melatoninrhythmus wieder ein. Abhängig von der obengenannten Lichtintensität ist die Wiederherstellungszeit des Melatoninrhythmus um so kürzer, je heller das Licht ist (49).

4.1.3 Kontrolle der Epiphysenfunktion durch das sympathische Nervensystem unter besonderer Berücksichtigung des Streß

Die sympathische (und optische) Kontrolle der Epiphysenfunktion verläuft über folgenden Weg (Abb. 2):

Abbildung 2: „Schema des Weges der Lichtimpulse zwischen Retina und Epiphyse der Ratte“ nach Wurtman, Cardinali (75)



Den Tractus accessorius opticus, der den Nervus opticus caudal vom Chiasma opticum verläßt, lateral vom Hypothalamus verläuft, um in der Nähe der Kreuzung zwischen Hypothalamus und Mesencephalon im Nucleus des Tractus accessorius inferior zu endigen. Der Verlauf der praeganglionären sympathischen Fasern zum Ganglion cervicale superius über Mittelhirn, Medulla oblongata und Rückenmark wird bei Cardinali (10) als noch hypothetisch angegeben. Die postganglionären sympathischen Fasern, von dem Ganglion cervicale superius ausgehend, enden in der Nachbarschaft der Pinealocyten. Über diesen neuronalen Weg bestimmen die Lichtbedingungen die Aktivität von Enzymen, die in die Melatoninsynthese einbezogen sind: der HIOMT, der aromatischen L-Aminosäuredecarboxylase und der Serotonin-N-Acetyltransferase. Wie die sympathische Innervation die Epiphysenfunktion kontrolliert, konnte durch biochemische und pharmakologische Studien an Rattenepiphysenkulturen in Erfahrung gebracht werden: Die Zugabe von Noradrenalin, dem postganglionären sympathischen Neurotransmitter, oder von Dibutyryl-cyclo-AMP stimuliert die ^{14}C -Melatoninsynthese aus ^{14}C -Tryptophan. Noradrenalin erhöht ebenso die Adenylcyclase-Aktivität und den cyclo-AMP-Gehalt der Rattenepiphyse. Die Noradrenalinstimulation der Melatoninbiosynthese wird durch β -adrenerge Rezeptoren vermittelt. Dieser Effekt wird nämlich durch Propranolol, einen β -Rezeptorenblocker, unterbrochen, während α -Rezeptorenblocker, wie z. B. Phenoxybenzamin, auf diesen Effekt keinen Einfluß ausüben (62). Die Aktivierung der Adenyl-

cyclase und von cyclo-AMP durch Noradrenalin – via β -adrenerge Rezeptoren – in den Parenchymzellen der Epiphyse bedingt eine parallele Aktivitätserhöhung von verschiedenen Enzymen der Melatoninbiosynthese: Tryptophan-Hydroxylase, Serotonin-N-Acetyltransferase und HIOMT (75). Pharmaka, die direkt oder indirekt die noradrenergen Rezeptoren aktivieren – wie z. B. L-Dopa (62) und Orciprenalin (36) – erhöhen die Melatonsyntheserate. Die parenterale Gabe von L-Dopa stimuliert bei Ratten die Melatonsynthese. Die sympathische Denervierung der Epiphyse potenziert diesen Effekt. Dieses könnte aus der Dopaminwirkung auf die Pinealocyten resultieren, das intravaskulär aus dem zirkulierenden L-Dopa gebildet wird und verstärkt aufgenommen wird.

Streß, der in Experimenten an Ratten einerseits durch Immobilisierung, andererseits durch Insulin-induzierte Hypoglykämie hervorgerufen wird, erhöht über eine allgemeine sympathische Aktivierung den Melatoningehalt der Epiphyse durch Aktivierung der an der Melatonsynthese beteiligten Enzyme. Diese Veränderungen manifestieren sich innerhalb der ersten zwei Stunden nach Einsetzen des Stresses und erscheinen trotz des Umstandes, daß die Versuchstiere einer konstanten Beleuchtung ausgesetzt sind (77, 49, 32). Die sympathische Denervierung der Epiphyse potenziert diese Reaktion auf Streß, während eine bilaterale Adrenalectomie diese abschwächt. Aus diesem Grund resultieren die Streßeffekte primär nicht aus der Noradrenalin-freisetzung aus den pinealen sympathischen Nerven, sondern vielmehr aus der Adrenalin-freisetzung aus dem Nebennierenmark in die Zirkulation. Es ist denkbar, daß Melatonin ein Streßhormon wie ACTH, Prolactin und Vasopressin darstellt (77).

4.1.4 Einfluß der Östrogene und verwandten Steroidhormone auf die Epiphysenfunktion

Östrogene und verwandte Steroidhormone steuern die Melatoninproduktion über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus. Exogenes Östradiol induziert histologische Veränderungen in den Pinealocyten (49, 14), erhöht den Gehalt der Epiphyse an Nucleinsäuren und Proteinen (41), hemmt die Aktivität der HIOMT in der Epiphyse (74) und blockiert die Noradrenalin-induzierte Aktivierung des Adenylcyclase-Systems in der Epiphyse (61) und die Noradrenalin-induzierte Hyperpolarisation der Pinealocytenmembran (22). Das Konzept der Epiphyse als Zielorgan der Geschlechtshormone wird durch die Tatsache unterstützt, daß sich ^3H -Östradiol (39) und ^3H -Testosteron (38) innerhalb der Rattenepiphyse nach systemischer Injektion dieser Hormone konzentriert. Die Fähigkeit der Epiphyse, Östradiol und Testosteron aufzunehmen, ähnelt derjenigen, die im Uterus und der Prostata beobachtet wird. Daraus läßt sich folgern, daß spezifische Rezeptoren für die Geschlechtshormone in den Pinealocyten vorhanden sind. Daher sind weibliche wie auch männliche Geschlechtshormone in die Regulation der Melatoninbiosynthese mit großer Wahrscheinlichkeit einbezogen.

4.2 *Wirkungen von Melatonin auf verschiedene Zielorgane*

Melatonin beeinflusst verschiedene Teilfunktionen der Geschlechtsorgane, der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse und der Nebennierenrinde.

4.2.1 *Hypothalamo-hypophyso-gonadale Achse*

- Pinealektomie und Melatoninapplikation

Wurtman und Cardinali (75, 10) haben in einer Vielzahl von Experimenten an Säugetieren, Fischen und Vögeln die endokrinen Veränderungen durch Pinealektomie und ihre teilweise Reversibilität durch Melatoninverabreichung dargestellt.

Der inhibitorische Effekt des Melatonins beim Säugetier auf die Hormone der hypophyso-gonadalen Achse wurde in verschiedenen Versuchen demonstriert. Im allgemeinen sind die durch Pinealektomie hervorgerufenen endokrinen Veränderungen nur von vorübergehender Natur, was beweist, daß das Fehlen der Epiphyse kompensiert wird. Die Melatonininjektion in den Hypothalamus oder Hirnstamm bewirkt eine Abnahme des LH-Gehalts der Hypophyse. Melatonin und Serotonin wirken auf die Releasing-Hormone des Hypothalamus, indem sie die Sekretion von LHRH (Luteinisierendes Hormon Releasing Faktor), FRF (Follikel stimulierendes Hormon-Releasing Faktor) und PIF (Prolactin Inhibiting Faktor) herabsetzen. Jedoch ist auch die Existenz eines Prolactin Releasing Faktors (PRF) wahrscheinlich, dessen Sekretion aus dem Hypothalamus durch Melatonin und Serotonin stimuliert wird (40). Anhand von Experimenten an Ratten haben Kamberi, Mical und Porter (23) nachgewiesen, daß die Melatonin- und Serotonininjektion in den III. Ventrikel die Prolactinfreisetzung stimuliert, während die FSH- und die LH-Freisetzung verhindert werden. Die Melatoninperfusion des III. Ventrikels blockiert die Ovulation bei geschlechtsreifen Ratten und verzögert die Vaginalöffnung bei präpuberalen Versuchstieren (75, 10).

Die Position des Hypothalamus und des Hirnstammes als Zielorgane der Melatoninwirkung wird dadurch bestätigt, daß intraperitoneale Melatonininjektionen den Serotoningehalt in diesen beiden Regionen erhöhen (75).

Werden Melatonin und Serotonin direkt in den Hypophysenvorderlappen appliziert, so ergeben sich keine bedeutenden Veränderungen in den Plasmakonzentrationen von Prolactin, FSH und LH (75, 10).

Daraus läßt sich schließen, daß die antigonadalen Effekte von Melatonin primär auf der Stufe des Hirnstamms oder des Hypothalamus ausgeübt werden, nämlich insofern, als Melatonin die Sekretion von LHRH unterdrückt.

In den III. Ventrikel injizierte Katecholamine, z. B. Dopamin, zeigen einen entgegengesetzten Effekt: Stimulation der FSH- und LH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen und die Inhibition der Prolactinausschüttung (23). Die direkte Applikation von Dopamin in den Hypophysenvorderlappen bewirkt keine Konzentrationsänderung der genannten Hormone. Daraus ergibt sich, daß Dopamin die Freisetzung

der Releasinghormone – LHRH, FRF und PIF – aus dem Hypothalamus stimuliert. Nach intraventrikulärer Dopamininjektion war ein Anstieg der Releasinghormone – LHRH, FRF und PIF – im Hypophysenstielblut zu verzeichnen.

Die antagonistische Wirkung von dopaminergem Mechanismus einerseits und serotonin- bzw. melatoninergem Mechanismus andererseits wird durch das CHIARI-FROMMEL-Syndrom veranschaulicht. Diese Störung ist charakterisiert durch Amenorrhoe und Galaktorrhoe bei Patientinnen, bei denen eine niedrige Gonadotropin-freisetzung und eine erhöhte Lactogenausschüttung nachweisbar sind. Diese Erkrankung wird mit einem Ungleichgewicht zwischen Serotonin und Melatonin auf der einen Seite und den Katecholaminen auf der anderen Seite erklärt.

Die Pinealektomie bei Ratten bewirkt dementsprechend einen Anstieg der Gonadotropinkonzentration in der Hypophyse (LH ↑, FSH ↑) (10). Dagegen steigt der Prolactingehalt der Hypophyse an, während die Prolactinserumkonzentration abnimmt.

Die antigonadalen Effekte von exogen zugeführtem Melatonin resultieren aber auch aus direkten Einflüssen auf die Gonaden und die äußeren Geschlechtsorgane, insofern, als Melatonin die testikuläre Androgenproduktion und die androgenen Effekte des Testosterons auf die Prostata und die Vesiculardrüsen hemmt (75).

Ein anderes in der Epiphyse durch das Enzym HIOMT synthetisierte Methoxyindol – 5-Methoxytryptophol – unterdrückt ebenfalls das Wachstum der Gonaden bei systemischer Gabe; dabei übt es vor allem einen inhibitorischen Einfluß auf das FSH aus (75).

– *Sonstige Einflüsse der Pinealektomie auf die Hypophyse*

Bei Rattenexperimenten verursachte die Pinealektomie weitere Veränderungen der Hypophyse (75, 10):

Eine Zunahme des Hypophysengewichtes und der Anzahl der Mitosen in der Hypophyse. Die neurosekretorische Aktivität des Nucleus supraopticus hypothalamicus und des Hypophysenhinterlappens nahm ab. Der Serotoningehalt der Hypophyse war erniedrigt. Außerdem war eine Hemmung der Wachstumshormonsekretion bei erblindeten Ratten zu beobachten; die Konzentration des Melanocyten-stimulierenden Hormons (MSH) war in der Hypophyse erhöht.

Dabei bewirkt eine intravenöse Injektion von Melatonin eine rapide MSH-Entleerung aus der Pars intermedia der Hypophyse bei Ratten und eine erhöhte Serotoninkonzentration in der Pars intermedia der Hypophyse. Die Melatoninapplikation nach Pinealektomie kehrte die beschriebenen Effekte um. Lediglich übte sie keinen Einfluß auf das Hypophysengewicht aus.

– *Erfolgsorgan: Gonaden*

Melatonin übt einen inhibitorischen Effekt auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse aus, der in niedrigeren zirkulierenden Konzentrationen der Steroidhormone resultiert. Es scheint, daß dieser Feedback-Mechanismus an der physiologischen Regulation der Gonadenfunktion teilnimmt.

Während der Schwangerschaft bleibt der Tag-Nacht-Rhythmus der Melatoninserumkonzentration erhalten. Anhand von Versuchen an Schafen konnte gezeigt werden, daß die Epiphyse bei der Konzeption, der Schwangerschaft und der Entbindung keine Rolle spielt (34).

4.2.2 *Schilddrüse*

Die Pinealektomie bewirkt bei einer Vielzahl von Säugetierspezies eine Hypertrophie der Schilddrüse. Sie verursacht vorübergehende Erhöhungen der Plasmakonzentration des Thyreotropins (TSH), der ^{131}J -Aufnahme durch die Schilddrüse und der Sekretionsrate der Schilddrüsenhormone. Letztere läßt sich durch Messung der ^{131}J -Menge feststellen, die die Schilddrüse durch Freisetzung der Hormone in die Zirkulation verliert (75, 10).

Umgekehrt hemmt die subcutane Melatonininjektion die Schilddrüsenvergrößerung, die der Pinealektomie folgt. Sie setzt die ^{131}J -Aufnahme durch die Schilddrüse und die Schilddrüsenhormonsekretionsrate herab (75, 10).

4.2.3 *Nebenschilddrüse*

Die Pinealektomie verursacht im Experiment an Ratten eine Hypertrophie der parathyreoidalen Zellen und andererseits – nach Entfernung der Nebenschilddrüse – muskuläre Spasmen und Tod ohne signifikante Veränderung der Plasmacalciumkonzentration, die wegen der Parathyreoidektomie sehr niedrig ist (75, 10).

Die konvulsiven Reaktionen konnten durch Melatonin nicht verhindert werden. Inwiefern Melatonin an diesen Erscheinungen beteiligt ist, wurde bisher nicht beschrieben (75, 10).

Andere Autoren fanden, daß Epiphysenextrakte einen der Pinealektomie umgekehrten Effekt produzieren, indem sie die konvulsive Schwelle erhöhen und vor der Induktion von konvulsiven Anfällen durch elektrische Stimulation der Hirnrinde schützen (14).

4.2.4 *Nebennierenrinde*

Die Epiphyse scheint an der Kontrolle der Nebennierenrindenfunktion beteiligt zu sein. Im Rattenexperiment trat nach einer Pinealektomie eine mäßige Hypertrophie der Nebenniere auf. Weiterhin entstand eine dreifache Erhöhung der Aldosteronkonzentration im Blut der Vv. suprarenales und der Corticoidplasmakonzentration. Erhöhte Steroidkonzentrationen waren für die Hypertension und die reduzierte Glucosetoleranz verantwortlich, die nach der Pinealektomie beobachtet wurden.

Im Gegensatz dazu bewirken Injektionen von Melatonin in den lateralen Ventrikel von Ratten eine signifikante Abnahme der Corticosteroidkonzentration im Plasma und eine Erniedrigung des Nebennierengewichtes. In vitro wirkt Melatonin direkt auf die Nebenniere insofern, als es die Steroidproduktion aus endogenen Vorstufen hemmt (75, 10).

Zusammenfassend kehrt Melatonin viele der endokrinen Veränderungen um, die als Folge der Pinealektomie erscheinen. Primärer Aktionsort des Melatonins sind die neuroendokrinen Zentren des Gehirns. Die Erhöhung der Serotoninkonzentration im Hypothalamus und Mittelhirn, die auf eine Melatoningabe folgt, spiegelt möglicherweise die Aktivitätsänderung der Serotonin enthaltenden Neuronen im Gehirn wider. Daher könnte Melatonin in vivo als ein Regler der Aktivität dieser Neuronen wirken. Die Hypothese wird teilweise dadurch bekräftigt, daß Melatonin auf die im Elektro-Encephalogramm nachweisbare cerebrale Aktivität, den Schlaf und das Verhalten bei verschiedenen Versuchstieren und auch den Menschen wirkt (2).

5. Regulation der Melatoninsekretion im menschlichen Organismus

Die Melatoninsekretion wird durch einen multifaktoriellen Mechanismus bedingt, der den Tagesrhythmus, die umgebenden Lichtbedingungen, Schlafverhalten, Medikamente und verschiedene Erkrankungen einschließt (62).

Die Regulation der Melatoninsekretion beim Menschen wird wie bei den Säugetieren durch die Funktion der Pinealocyten als neuroendokrine Schaltstelle, die optischen Bedingungen und das sympathische Nervensystem bestimmt. Die in dem Kapitel 4.1 aufgeführten Regulationsmechanismen treffen daher für den menschlichen Organismus weitgehend in gleicher Weise zu.

5.1 Tagesrhythmik, Lichtbedingungen, Schlaf und Schlafentzug, Ortswechsel

- Tagesrhythmik

Die Melatoninforschung während der letzten Jahre wies den anhand von Tierexperimenten gefundenen 24-Stunden-Rhythmus der Melatoninkonzentration in der Epiphyse, im Blut und Urin auch beim Menschen nach (33, 9, 3, 63, 1, 58, 65, 45).

Während des Tages findet sich beim Menschen eine Melatoninserumkonzentration von unterhalb der Nachweisgrenze (negativ, außerhalb des Bestimmungsbereiches) bis ungefähr 20 µg/ml, die während der Nacht um das 4- bis 5fache mit einem Gipfel bei 2.00 Uhr ansteigt (33). Die Melatoninausscheidung im Urin folgt diesem Tag-Nacht-Rhythmus mit einem Peak um 8.00 Uhr des Morgenurins und niedrigen Tageswerten. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem 2.00 Uhr-Wert der Melatoninserumkonzentration und dem 8.00 Uhr-Wert des Morgenurins beträgt 0,89 (62).

- Lichtbedingungen

Erst seit ca. 8 Jahren werden die Einflüsse von konstanter Beleuchtung bzw. Dunkelheit auf die Epiphyse des Menschen untersucht (49). Während, wie oben beschrieben, bei Tieren durch ständigen Lichtreiz der circadiane Melatoninrhythmus unterdrückt wird, bleibt dieser Rhythmus beim Menschen während einer längeren Lichtperiode bestehen. Diese Beobachtung ist jedoch wahrscheinlich auf ein experimentelles Artefakt durch eine zu niedrige Intensität der Beleuchtung zurückzuführen. Im

Rattenexperiment wurde bereits die Abhängigkeit des Melatoninrhythmus von der Lichtintensität bewiesen, jedoch stehen diese Versuche beim Menschen noch aus (49).

Eine um vier Stunden verlängerte Dunkelheitsperiode, während der vier Probanden wach waren und festgelegte Aktivitäten ausübten, verändert die Melatoninserumkonzentrationen: Es zeigt sich ein nach 6.00 Uhr verschobener Gipfelwert der nächtlichen Serumkonzentrationen mit geringer abnehmenden Werten bis 10.00 Uhr als im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unter normaler Tag-Nacht-Rhythmik. Vor diesem Versuch hatten sich die Probanden an einen konstanten Schlaf-Wach-Rhythmus mit einem definierten Aktivitätsmuster und Lichtbedingungen angepaßt. Es wird vermutet, daß der Melatoninrhythmus nur zum Teil von den umgebenden Lichtbedingungen beeinflußt wird und neben dem Beginn der Dunkelheit und des Schlafes auch von der gesamten Dauer der Dunkelheit und des Schlafes bestimmt wird (62).

- *Schlaf und Schlafentzug*

Wenn Versuchspersonen während ihrer normalen nächtlichen Schlafperiode unter einer konstanten Beleuchtung wach bleiben und während des Tages schlafen, gleichen einige von ihnen – nämlich Schichtarbeiter, die gewöhnt sind, zu unterschiedlichen Tageszeiten zu schlafen – ihren Epiphysenrhythmus und damit die Melatoninsekretion sofort an. Andere benötigen für die Umstellung mehrere Tage. Mit Training kann die Anpassung an neue Lichtverhältnisse und die Angleichung von neuroendokrinen und Verhaltensrhythmen an einen neuen Tag-Nacht-Rhythmus erleichtert werden (78).

In einer Untersuchung wird bei zwölf gesunden Probanden die Melatoninurinausscheidung – die wie oben angegeben eng mit den Melatoninserumkonzentrationen verknüpft ist (62) – während eines 64 Stunden dauernden Schlafentzugs unter konstanter Beleuchtung bestimmt. Diese zeigt einen aufrechterhaltenen circadianen Rhythmus, wobei die Melatoninausscheidung mit zunehmendem Schlafentzug ansteigt. Die Melatoninurinausscheidung während der Wiederaufnahme des Schlafes unterscheidet sich nicht von den Ausgangswerten während der normalen Schlafperiode (1).

Werden das Licht während der Schlafphase plötzlich angeschaltet und der Proband geweckt, so findet sich kein Abfall der Melatoninkonzentrationen in Serumproben, die 30 Minuten vor bis 30 Minuten nach dem Ereignis in 5minütigen Abständen entnommen wurden (62).

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Tierversuchen, die bei gleichen Bedingungen einen Konzentrationsabfall zeigen (20).

- *Ortswechsel*

Die Anpassung des circadianen Melatoninrhythmus, gemessen an der Melatonin-Urin-Konzentration, an einen Ortswechsel von 18° östlicher Länge (Stockholm) nach 118° westlicher Länge (Los Angeles) mit einer Zeitdifferenz von neun Stunden

erfolgte innerhalb von sieben Tagen nach Ankunft in Los Angeles. Dabei erfolgte die Umstellung um so schneller, je jünger die Probanden (im Alter zwischen 12 und 49 Jahren) waren (62).

5.2 *Sympathisches Nervensystem mit Berücksichtigung des Streß*

Die Melatoninforschung am Menschen konnte ebenfalls den Beweis für die sympathische Innervation der Epiphyse erbringen (62, 36, 63, 31).

Die Untersuchungen zur Stimulation der Melatoninsekretion mit β -Rezeptoren-Agonisten – wie z. B. L-Dopa – lieferten bisher keine eindeutigen Ergebnisse. Zum einen erfolgte auf die orale Gabe von 500 mg L-Dopa bei sechs Patienten mit verschiedenen endogenen Störungen keine Konzentrationsänderung von Melatonin in Serumproben, die in 2stündlichen Intervallen nach der L-Dopa-Gabe entnommen wurden (62). Zum anderen wurde auf die orale Gabe von 500 mg L-Dopa eine höhere Serummelatoninkonzentration 2 Stunden nach Verabreichung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gefunden, wobei dieser Unterschied nicht signifikant sein soll (36). Die Wirkung einer parenteralen L-Dopa-Gabe ist bisher noch nicht untersucht worden, da ernsthafte kardiovaskuläre Wirkungen zu befürchten sind. Nach Verabreichung einer oralen Dosis von 5 mg Bromoergocryptin – einem Dopamin-Rezeptoragonisten – blieben Konzentrationsänderungen in den Serumproben eines endokrinologischen Patienten aus (62). Eine andere Studie an 30 gesunden Testpersonen ermittelte nach oraler Gabe von 5 mg Bromoergocryptin einen deutlichen Abfall der Melatoninserumkonzentration nach vier Stunden (8).

Der β -Rezeptorenantagonist Propranolol blockiert während der Nacht den Melatoninanstieg im Serum. Dabei ergab sich eine lineare Dosis-Wirkungskurve mit 120 bis 160 mg Propranolol (31).

Wie im Kapitel 4.1.3 beschrieben, verursacht Streß im Tierexperiment eine Aktivierung der an der Melatonsynthese beteiligten Enzyme und einen Anstieg der Melatinkonzentration (77, 49, 32).

Diese Reaktionen auf Streß konnten beim Menschen bisher nicht nachgewiesen werden. In einer Untersuchung wurde an 13 gesunden Probanden eine Lumbalpunktion durchgeführt, die als Streßfaktor definiert wurde (62). Die Serumproben, die eine Stunde vor und während der Lumbalpunktion entnommen wurden, zeigten keine Unterschiede in den Melatinkonzentrationen (62). Ebenso blieben die Melatonsynthese und -sekretion, gemessen an der Melatonausscheidung im Urin, bei 12 gesunden Probanden während eines 64 Stunden dauernden Schlafentzugs als Streß verursachender Faktor unbeeinflusst (62). Es bleibt zu klären, ob Streß von längerer Dauer und unterschiedlicher Intensität einen Einfluß auf die Melatonsynthese und -sekretion im menschlichen Organismus ausübt.

5.3 *Altersabhängigkeit der Melatoninsekretion*

Die circadiane Rhythmik der Melatoninsekretion mit hohen Nachtwerten der Melatoninserumkonzentration und niedrigen Tageswerten ist bei Kindern bzw. Jugendlichen im Alter von 1 Monat bis zu 20 Jahren nachweisbar (6). Jedoch neigen die nächtlichen Melatoninserumkonzentrationen bei älteren Kindern mit beginnender bzw. fortschreitender Pubertät niedriger zu sein als bei jüngeren und Kleinkindern (68) (s. u. Kap. 5.4).

In welchem Alter beim Menschen der normale circadiane Melatoninrhythmus auftritt, konnte bisher nicht geklärt werden (52). In der Amnionflüssigkeit konnte mittels RIA (6) kein nachweisbares Melatonin gefunden werden. Bei Neugeborenen am 1. und am 6. Lebenstag wurden fast konstante Melatoninserumkonzentrationen um 20 pg/ml ohne den normalen circadianen Rhythmus ermittelt. Im Gegensatz dazu zeigten Melatoninserumbestimmungen bei einem 8jährigen Kind den normalen Tag-Nacht-Rhythmus (52).

5.4 *Einfluß der Gonadenfunktion auf die Melatoninsekretion*

Die ermittelten Plasmamelatoninkonzentrationen korrelieren eng mit verschiedenen Steroiden im Plasma (Testosteron, 17-Hydroxyprogesteron, Cortisol), insofern, als z. B. während der Pubertät mit ansteigendem Testosteronspiegel die nächtliche Melatoninkonzentration abnimmt (68). Dabei existieren unterschiedliche Auffassungen über die Melatoninkonzentrationen im Blut und Urin während der Pubertät:

Auf der einen Seite ergaben Melatoninbestimmungen durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie im praepubertären Stadium ohne irgenwelche Zeichen der körperlichen Pubertät das 8bis 10fache gegenüber denjenigen Werten nach vollendeter Pubertät (28). Während Melatonin mit zunehmender Pubertätsentwicklung abnimmt, steigen die LH-Werte kontinuierlich an (28).

Auf der anderen Seite ergaben Melatoninbestimmungen im Serum und Urin mit einem RIA (6) keine unterschiedlichen Konzentrationen während der verschiedenen Pubertätsstadien unabhängig vom Geschlecht der Probanden und dem Zeitpunkt der Probenentnahme während des Tages oder der Nacht (52). Somit konnte der in Tierexperimenten gefundene hemmende Effekt des Melatonins auf die Gonadotropin-freisetzung in der Hypophyse (28) und damit die Unterdrückung der sexuellen Reifung durch Melatonin nur teilweise beim Menschen bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den abnehmenden Melatoninkonzentrationen während der normalen Pubertät ergab eine RIA-Studie hohe Melatoninwerte mit erhaltener circadianer Schwankung bei idiopathischer Pubertas praecox (68). Dieses Resultat konnte jedoch durch eine vergleichende Untersuchung bei Pubertas praecox nicht bestätigt werden, die keine Unterschiede zwischen den Melatoninwerten im Blut und der CSF bei Pubertas praecox und einer gesunden Kontrollgruppe ergab (52).

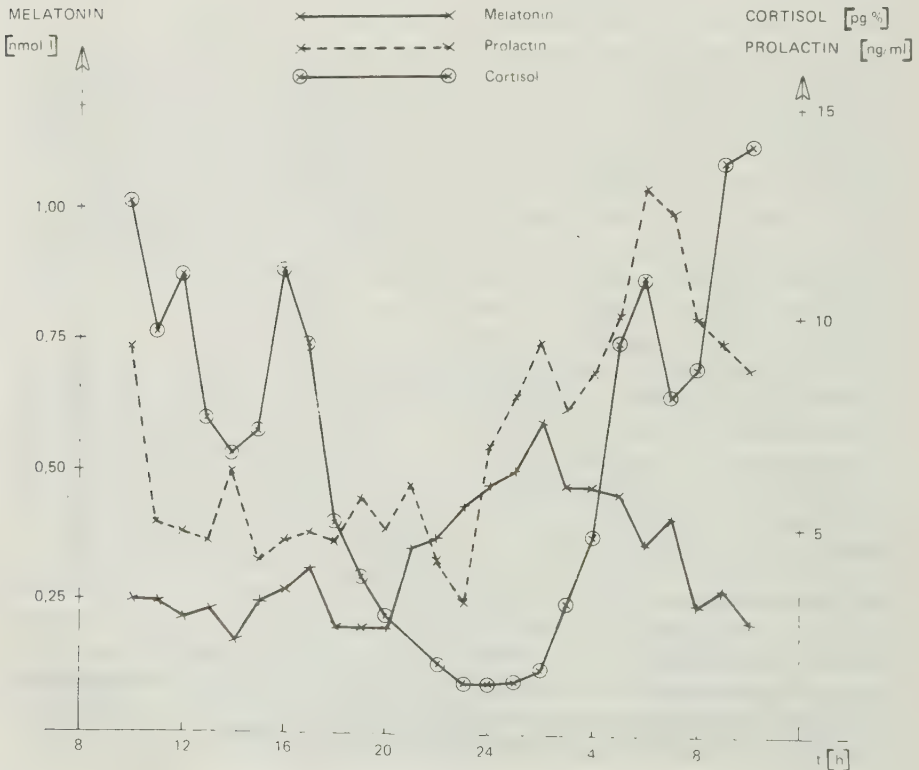
Zyklusabhängigkeit

Während eines Menstruationszyklusses wurden die Melatoninkonzentrationen im Blut bei fünf gesunden Probandinnen ermittelt, die Werte zwischen 47 und 481 $\mu\text{g/ml}$ ergaben (64). Der Konzentrationsverlauf hatte einen Gipfel während der Menstruationsblutung und den niedrigsten Wert während der Ovulation.

5.5 Cortisol, Prolactin und Melatonin

Die Relation zwischen der 24-Stunden-Rhythmik der Plasmakonzentrationen von Cortisol, Prolactin und Melatonin wurde an drei gesunden weiblichen Probanden untersucht (62). Die Ergebnisse zeigten, daß eine zeitliche Beziehung zwischen diesen Hormonkonzentrationen insofern existiert, als der Melatoninkonzentrationsanstieg den Erhöhungen von Prolactin und Cortisol vorangeht (Abb. 3) (62).

Abbildung 3: „Melatonin, Prolactin und Cortisol im Plasma von drei gesunden, weiblichen Probanden mit einem regelmäßigen Schlaf-Aktivitäts-Rhythmus“
Schlaf und Dunkelheit während 23.00 und 7.00 Uhr nach Wetterberg (62)



6. Melatonineffekte beim Menschen

Der am gründlichsten erforschte Effekt des Melatonins beim Menschen ist seine allgemein sedierende und Schlaf herbeiführende Wirkung (78, 1); so konnten über 40 Jahre bekannte, schwere Schlafstörungen einer 66jährigen Patientin, durch eine Stägige orale Melatoningabe in der Dosis von 100 mg/d deutlich gebessert werden (63).

In einer Studie zeigte der durch Melatonin erzeugte Schlaf beim Menschen einen Anstieg der Häufigkeit der REM-Phase (2). Dagegen ergab eine andere Untersuchung eine normale Verteilung der Schlafphase nach Melatoningabe (16). Ungeachtet welche Versuchsergebnisse bestätigt werden, ist es von Bedeutung, daß alle anderen Hypnotika den normalen Schlafverlauf derart aufspalten, daß die REM-Phasen unterdrückt werden.

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung des Melatonins als mögliches Therapeutikum bei Fertilitätsstörungen, in der Psychiatrie und der Dermatologie diskutiert (63). Ein therapeutischer Versuch mit Melatonin bei Schizophrenen und endogenen Depressionen wurde in der Vorstellung unternommen, daß Melatonin die Stimmungslage bei Gesunden verbessert und Schlaf bewirkt (67). Jedoch zeigten sich in beiden Fällen eine deutliche Exazerbation der Symptome (67).

Die orale Gabe von Melatonin verursacht beim Menschen einen schnellen und deutlichen Anstieg der STH-Serumkonzentration und verhindert die STH-Freisetzung nach Stimulation mit L-Dopa. Dagegen beeinflußt eine i.v.-Infusion mit insgesamt 500 mg Melatonin (2,1 mg/min.) die Serumkonzentration von STH nicht (33).

7. Melatoninsekretion bei verschiedenen Erkrankungen

7.1 *Epiphysentumoren*

Die erste Beschreibung eines Epiphysentumors stammt aus dem Jahr 1831 durch den Wissenschaftler¹ Otto. Bereits 1899 erkannte Heubner in Deutschland Zusammenhänge zwischen Pubertras praecox und Epiphysenneoplasie (67).

Der Begriff „Pinealom“ bezieht sich auf drei verschiedene Typen der Epiphysentumoren (75, 76):

1. parenchymales Pinealom = „wahres Pinealom“, über 50 % aller Pinealome
2. nichtparenchymales Pinealom
 - a) Teratome 10 bis 15 %
 - b) Pinealome vasculären oder glialen Ursprungs
3. ektopisches Pinealom

Die zu der ersten Gruppe gehörenden parenchymalen Pinealome entstehen innerhalb der Epiphyse und scheinen dem normalen Organ während seines späten embryonalen Stadiums zu gleichen. Histologisch bestehen sie aus zwei unterschiedlichen Zell-

typen: Einerseits aus großen, spheroidalen epithelialen Zellen - den „Parenchymzellen“ - und andererseits aus kleinen, dunkelgefleckten Zellen, die eine den Lymphocyten ähnliche Ultrastruktur aufweisen.

Der zweite Typ - die nichtparenchymalen Pinealome - wird in Teratome und Pinealome vasculären oder glialen Ursprungs eingeteilt.

Die Teratome machen 10 bis 15 % der überhaupt beschriebenen Pinealome aus. Sie bestehen aus Schleim sezernierenden, säulenförmigen, epithelialen Zellen, adenocarcinomatösem Gewebe und anderen Gewebsarten, die dem Schilddrüsen-, Knorpel-, Knochen- oder Nervengewebe ähneln.

Die dritte Gruppe - die ektopischen Pinealome - entstehen im Gehirngewebe außerhalb der Epiphyse, während die Epiphyse selbst keinen pathologischen Befund aufweist. Histologisch entsprechen die ektopischen den parenchymalen Pinealomen.

Die Zeichen und Symptome, die mit den drei Pinealomtypen verbunden sind, differieren sehr und hängen von der Lokalisation sowie der histologischen Beschaffenheit der Epiphysentumoren ab.

Tumoren, die innerhalb der Epiphyse entstehen, manifestieren sich klinisch durch Symptome, die von ihrer Lokalisation herrühren; nämlich interner Hydrocephalus, erhöhter Druck der CSF und oculomotorische Zeichen, wie das Parinaud-Syndrom - vertikale Blicklähmung durch z. B. ein Pinealom.

Im Gegensatz dazu erzeugen die nichtparenchymalen Pinealome, insbesondere die Teratome, eine Pubertas praecox.

Bei ungefähr einem Drittel der Jungen, die an einem Pinealom leiden, ist eine Pubertas praecox nachweisbar. Aus ungeklärten Gründen tritt ein Pinealom bei Mädchen selten auf und ist dann nicht mit einem vorzeitigen Erscheinen der Menarche verbunden.

Das Pinealom stellt in 10 bis 15 % aller Fälle von Pubertas praecox die Ursache für dieselbe dar.

Zunächst bestand die Vorstellung im Sinne einer „Druckhypothese“, die die vorzeitige sexuelle Entwicklung mit dem von den Pinealomen verursachten, erhöhten intracraniellen Druck und dem Ausmaß der Invasion der Pinealome in das umgebende Hirngewebe erklärt (25, 72). Die neueren Untersuchungen konnten jedoch diese Vermutung nicht erhärten, sondern ergaben eine enge Korrelation der sexuellen Reifung mit der histologischen Zusammensetzung der Tumoren.

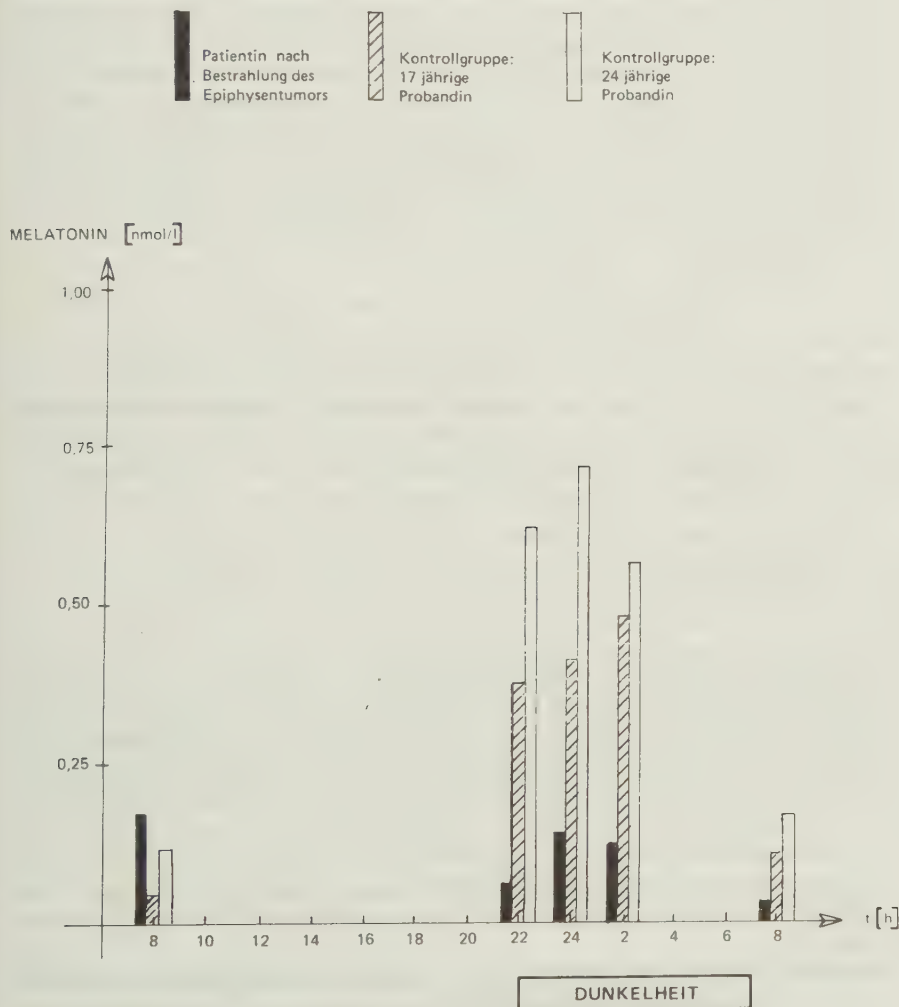
So tritt die Pubertas praecox am häufigsten bei den nichtparenchymalen oder wenig differenzierten Pinealomen auf, da die Epiphyse nicht imstande ist, das die sexuelle Entwicklung hemmende Hormon - Melatonin - zu bilden (68, 67, 25, 72).

Andererseits verursachen die parenchymalen, gut differenzierten und wahrscheinlich aktiv sezernierenden Pinealome aufgrund einer gesteigerten Melatoninsynthese eine Pubertas tarda und Hypogonadismus (67, 25, 72). Parenchymale Pinealome weisen nach Bestrahlung eine gute, jedoch nur vorübergehende Remission auf. Die Patienten erhalten 3000 bis 5000 rad; das Bestrahlungsfeld muß ein großes Gebiet umfassen, da Pinealome häufig durch den Ventrikel und den Subduralraum metastasieren. Nach Bestrahlung eines Epiphysentumors war der Tag-Nacht-Rhythmus der Melatonin-

Plasma-Konzentration bei einer 40jährigen Patientin aufgehoben (62), (Abb. 4). In einer anderen Studie lagen die Werte der Melatoninurinausscheidung bei Zustand nach Bestrahlung eines Pinealoms unterhalb der bestimmaren Grenze (75).

Abbildung 4: „Plasmakonzentration von Melatonin bei einer 40jährigen Patientin nach Bestrahlung eines Epiphysentumors und bei zwei gesunden Probandinnen, im Alter von 17 bzw. 24 Jahren“
Der circadiane Rhythmus der Melatonin-Plasma-Konzentration war nach Bestrahlung des Epiphysentumors aufgehoben.

Nach Wetterberg (62)



Die ektopischen Pinealome entstehen gewöhnlich im Hypothalamus, im Infundibulum-Gebiet. Daher zeigen die betreffenden Patienten ein Krankheitsbild, welches demjenigen eines Craniopharyngeoms gleicht: Die klinische Trias der bitemporalen Hemianopsie, des Hypopituitarismus und des Diabetes insipidus. Viele ektopischen Pinealome zeigen eine gute klinische Reaktion auf Bestrahlung.

7.2 *Hypophyseninsuffizienz*

Die Beziehung zwischen Hypophysentumoren, ihrer Therapie und der Epiphyse sind noch nicht geklärt: Bei einem 12 Jahre alten Mädchen mit einem Craniopharyngeom wurden niedrige Melatoninserumwerte während des Tages und der Nacht ermittelt, die mit der mechanischen Alteration der Epiphyse erklärt werden (68). Andererseits zeigten sich bei zwei Patienten mit großen Hypophysentumoren vereinzelt abnorm hohe Melatoninwerte im Blut bei aufgehobenem circadianem Rhythmus (62).

Bei vier Patienten mit Panhypopituitarismus, der auf die Bestrahlung von Hypophysentumoren folgte, lagen die Plasmamelatoninkonzentrationen während des Tages und der Nacht unterhalb der bestimmbaren Grenze (kleiner als 0,05 nmol/l bzw. 11,6 ng/l) (62).

7.3 *Primärer Hypogonadismus*

Während 24 Stunden wurden die Serumkonzentrationen der Gonadotropine und des Melatonins bei Kindern mit Turner-Syndrom (Alter 13 bis 16 Jahre, Knochenalter 11 bis 14 Jahre) bestimmt und miteinander verglichen (67). Während die Gonadotropine extrem hohe Werte ohne einen circadianen Rhythmus zeigten, ergab sich in der Melatoninkonzentration keine Veränderung gegenüber einer normalen Kontrollgruppe mit erhaltenem Tag-Nacht-Rhythmus (67).

Das Klinefelter-Syndrom geht mit einer Erniedrigung sowohl der Tages- als auch der Nacht-Melatoninserumkonzentrationen einher (68).

7.4 *Nebennierenrindenfunktionsstörungen*

Ein unbehandelter Patient mit einer hyperadrenocorticotropen Form des Cushing-Syndroms (hohe ACTH- und erhöhte Cortisol-Werte ohne circadiane Schwankung) zeigte hohe Tages- und Nacht-Melatoninserumwerte. Bei einem mit Dexamethason therapierten Patienten mit derselben Erkrankung wurden niedrige Melatoninwerte im Serum ermittelt (68). Es wird daher vermutet, daß Dexamethason einen hemmenden Einfluß auf die Epiphyse ausübt (63, 68).

Hohe Melatoninserumwerte in der Nacht ergaben sich bei zwei Patienten mit M. Addison mit niedrigem Plasmacortisolspiegel und hohen ACTH-Werten. Daraus resultiert die Annahme, daß Steroide einen suppressiven Effekt auf Melatonin haben (68).

Die Melatoninserumkonzentration eines Patienten mit adrenogenitalem Syndrom (hoher Testosteronspiegel, hohe ACTH-Konzentration) war höher im Vergleich zu

einem Patienten, der an der gleichen Erkrankung litt und mit einer Cortisolsubstitution therapiert wurde. Bei beiden Patienten zeigte sich ein deutlicher circadianer Rhythmus. Auch dieses Ergebnis könnte als Beweis für den unterdrückenden Effekt des Cortisols auf Melatonin gewertet werden (68).

7.5 Psychiatrische Erkrankungen

Psychosen vom schizophrenen und manisch-depressiven Formenkreis sind aufgrund ihres phasenhaften Auftretens für die Melatoninforschung von besonderem Interesse. Jedoch zeigten sich weder bei unbehandelten Patienten mit Schizophrenie noch mit manisch-depressiver Erkrankung von den normalen Tag-Nacht-Schwankungen abweichende Melatoninwerte im Blut und bei letztgenannter Krankheit auch in der CSF. Erwartungsgemäß erfolgte auf die Propranololtherapie der Schizophrenie ein Absinken der Melatoninplasmakonzentration (62, 67). Auch nach der Elektrokonsultivbehandlung (ECT) bei endogener Depression erfolgte trotz bekannten Prolactinanstiegs keine Änderung der Melatoninkonzentration im Plasma (62).

8. Methoden der Melatoninbestimmung

Die Melatoninforschung nahm erst durch die Erarbeitung verschiedener Bestimmungsmethoden ihre entscheidende Weiterentwicklung.

- Indirekter Hydroxy-Indol-O-Methyltransferase (HIOMT)-Assay

Nachdem Lerner und seine Mitarbeiter (29) die chemische Struktur des Melatonins identifizierten, zeigten Axelrod und Weisbach (7), daß die Epiphyse diejenigen Enzyme enthält, die für die Melatoninsynthese aus der Stammamino-säure Tryptophan nötig sind. Eines dieser Enzyme - Hydroxy-Indol-O-Methyltransferase (HIOMT) - machte man sich für einen sogenannten indirekten HIOMT-Assay zunutze, da bisher keine Methode zur direkten Bestimmung von Melatonin in der Epiphyse und in Körperflüssigkeiten zur Verfügung stand. Dabei untersuchte man Effekte von experimentellen Manipulationen auf die HIOMT, die in vitro gemessen wurde. Man setzte voraus, daß die resultierenden Enzymaktivitäten parallel mit entsprechenden Veränderungen in der Melatoninsynthese und -sekretionsrate einhergingen (77). Bisher wurde noch keine Ausnahme zu der Regel gefunden, daß die Enzymaktivität mit der Bildung des hormonalen Produktes eng korreliert (77). Der indirekte HIOMT-Assay an der Säugetierepiphyse zeigte, daß das umgebende Licht die Epiphysenfunktion unterdrückt und die Melatoninsynthese rhythmisch mit dem Hell-Dunkel-Tagesablauf variiert (77).

- Bioassay, Radioimmunoassay, Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Um 1970 wurde der indirekte HIOMT-Assay durch sehr empfindliche Melatonin-Assays abgelöst, die die Beziehung zwischen der HIOMT-Aktivität und der Melato-

ninsekretion untersuchten und bestätigten. Sie ermöglichten die direkte Bestimmung von Melatonin im Blut, Urin und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Tieren und Menschen. Zum einen basieren sie auf der biologischen Reaktion der Amphibien auf Melatonininjektion, nämlich der Aufhellung der Haut – als Bioassay (78) – und zum anderen auf immunologischen und chemischen Eigenschaften des Melatoninmoleküls – als Radioimmunoassay (RIA) (5, 51, 30, 6, 65, 27), Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS) (54). Obwohl Melatonin-Bioassays eine hohe Spezifität und Sensitivität (weniger als 0,1 ng) aufweisen, wird ihre allgemeine Anwendung als Standardlaborverfahren durch die zahlreichen komplizierten Schritte zur Probenvorbereitung begrenzt (78).

Die GCMS besitzt eine hohe Sensitivität von weniger als 10 ng (78) und stellt die spezifischste Methode zur Identifizierung und Messung von Melatonin dar (54). Sie gestattet die Identifizierung des Moleküls einerseits durch dessen chromatografisches Verhalten und andererseits durch die Masse des Molekülpeaks bzw. die Massen der Fragmente, die bei der Massenfragmentierungsreaktion entstehen.

Der Radioimmunoassay verkörpert jedoch eine relativ unaufwendige Nachweismethode als Standardlaborverfahren und besitzt eine Sensitivität von ca. 25 ng/l (78).

II. FRAGESTELLUNG

Anhand von Tierexperimenten konnte ein hemmender Einfluß der Epiphyse auf die Hormone der hypothalamo-hypophyso-gonadalen Achse nachgewiesen werden (siehe Kapitel I. 4.2.1).

Im menschlichen Organismus existieren enge Korrelationen zwischen Melatonin und dem Luteinisierenden Hormon (LH) sowie den Geschlechtshormonen (siehe Kap. I. 5.4). Dabei wurde eine umgekehrte Proportionalität insofern gefunden, als mit zunehmender Pubertät die Melatoninhormonkonzentration abnimmt und im Gegensatz dazu die LH-Konzentration kontinuierlich ansteigt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollen klären, ob eine entgegengesetzte Beeinflussung zwischen einer LHRH-Stimulation und der Melatoninsekretion existiert. Als Indikator wird der im Rahmen des circadianen Rhythmus erfolgende nächtliche Melatoninkonzentrationsanstieg im Serum und Urin untersucht.

Nach genauer Prüfung der radioimmunologischen Bestimmungsmethode mit ihren Modifikationen zur Verbesserung der Sensitivität hat die Arbeit außerdem das Ziel, die circadiane Spontanrhythmik der Melatoninsekretion im Serum und Urin nachzuweisen, die Melatoninausscheidung im Urin zu messen und mit den Serumkonzentrationen zu vergleichen.

Neben dem LHRH-Hypophysenbelastungstest wird der Einfluß eines Barbiturats auf die Melatoninsekretion untersucht.

III. METHODIK

Die radioimmunologische Bestimmung von Melatonin nach Wetterberg (65) wird mit den Parametern der Qualitätskontrolle geprüft, mit der radioimmunologischen Bestimmungsmethode nach Arendt (5) verglichen und zur Verbesserung der Sensitivität des Verfahrens modifiziert.

Melatonin wird nach einer modifizierten radioimmunologischen Methode nach Wetterberg im Serum und Urin von 4 Probanden gemessen und der Tag-Nacht-Rhythmus der Melatoninsekretion bestimmt.

Der Einfluß eines Barbiturats sowie eines LHRH-Hypophysenbelastungstests auf die Epiphysenfunktion wird untersucht und mit Kontrollwerten einer Leerbeobachtung verglichen.

IV. BESTIMMUNGSMETHODE

1. Allgemeine Prinzipien radioimmunologischer Techniken

Der Radioimmunoassay (RIA) verbindet die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Substanzen mit der großen Spezifität immunologischer Reaktionen (17). Dem radioimmunologischen Nachweisverfahren, das 1959 von Yalow und Berson erstmals beschrieben wurde, liegt das Prinzip der Konkurrenz von markiertem und unmarkiertem Antigen (Ag) um deren Bindung an einen spezifischen Antikörper (Ak) zugrunde (79, 80).

Um die unbekannte und gesuchte Antigenkonzentration einer Probe bestimmen zu können, müssen die übrigen Größen des Reaktionssystems – markiertes Antigen und Antikörper – konstant bleiben.

Gemäß empirischer Erhebungen sollte die Antikörperkonzentration so bemessen sein, daß in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen $\leq 50\%$ des markierten Antigens gebunden werden.

Die spezifische Bindung zwischen Antigen und Antikörper hängt in starkem Maße von der Spezifität des Antikörpers ab. Diese wird bestimmt durch die determinante Gruppe des Antigens. Besitzt jedoch das Antigen ein niedriges Molekulargewicht, so erscheint es notwendig, dieses als Hapten an ein Trägermolekül wie Albumin, Polylysine oder Polyäthylenglykol zu koppeln. Dabei ist zu beachten, daß die Bindung an das Trägermolekül nicht willkürlich stattfindet, so daß z. B. funktionelle Gruppen und deren Umgebung verändert werden könnten.

Das gleiche Problem stellt sich bei der Markierung des Antigens mit einem radioaktiven Isotopen (38). Von der radioaktiven Markierung des Antigens hängt das Bindungsverhalten zwischen Tracer und Antikörper einerseits und unmarkiertem Antigen und Antikörper andererseits ab.

Als Markierungsverfahren unterscheidet man Austausch- und Oxidationsvorgänge. Das radioaktive Melatonin-Hormon als Tracer im RIA entsteht durch eine Austauschreaktion zwischen Halogen und Tritium. Diese Tritiierung bedeutet einerseits den Vorteil, daß das Antigen nur geringfügig oder gar nicht in seinen für die Antikörperbindung spezifischen Eigenschaften verändert wird, bringt aber andererseits den Nachteil mit sich, daß die spezifische Radioaktivität niedrig ausfällt.

Im Gegensatz dazu geht die Oxidation bei Jodierung zu einem radioaktiven Isotopen mit großen Veränderungen der spezifischen Antikörperbindungseigenschaften einher (18).

Der Versuch, die niedrige spezifische Radioaktivität des tritierten Isotops mit höher markierten Molekülen auszugleichen, ergibt eine relative Unbeständigkeit des Tracers (17).

Anhand einer Eichkurve, die durch Zugabe von unmarkiertem Antigen in verschiedenen bekannten, kontinuierlich abfallenden Konzentrationen zu konstanten Mengen an markiertem Antigen und Antikörper entsteht, werden die in cpm (counts per minute) gemessenen Werte in Konzentrationsangaben, z. B. ng/l, transformiert.

Die Proben der Standarddeichkurve und diejenigen aus dem Untersuchungsmaterial (z. B. Blut, Urin oder CSF) werden inkubiert, die Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag-Ak-Komplexe) werden von dem freien, nichtgebundenen Antigen durch Aus-salzen, z. B. mit Ammoniumsulfat, getrennt, und das Präzipitat, bestehend aus markierten und unmarkierten Ag-Ak-Komplexen, wird gemessen. Dieses Trennungs-verfahren erfolgte zunächst mit einem „solid phase“ genannten Träger (66), später mit Natriumsulfat, Äthanol und Ammoniumsulfat, Elektrophorese, der Absorption an Kohle, Zellulose, Ionenaustauscher und einem zweiten Antikörper (13).

Die Zählrate der im Zähler gemessenen Ag-Ak-Komplexe wird um so höher ausfallen, je mehr radioaktiv markiertes Antigen gebunden wurde und um so niedriger, je mehr unmarkiertes Antigen in der Probe vorhanden und zu bestimmen ist, das das mar-kierte Antigen (Tracer) kompetitiv von den Antikörperbindungsstellen verdrängt.

2. Qualitätskontrollen beim Radioimmunoassay

Die Ergebnisse eines Analysenansatzes werden einer Qualitätskontrolle unterworfen, um sie untereinander, mit Ergebnissen unterschiedlicher Versuchstage und anderer Versuchsansätze der gleichen Methode oder unterschiedlicher Nachweisverfahren zu vergleichen (48).

- Definition der Parameter der Qualitätskontrolle

Aus der Vielfalt an Parametern der Qualitätskontrolle eines Radioimmunoassays (53, 50, 19, 47) werden folgende ausgewählt:

1. Richtigkeit (accuracy) [% vom Sollwert]
2. Präzision [%]
 - a) Intraassay-Varianz
 - b) Interassay-Varianz
3. Assay-Parameter
 - a) Gesamtaktivität
 - b) nichtspezifische Bindung (P) = Leerwert
 - c) spezifische Bindung (B_0)
 - d) Standarddeichkurve
 - e) Sensitivität
 - f) Recovery = Wiederfindung eines eingesetzten markierten oder unmar-kierten Hormons

- 1. Richtigkeit (accuracy)

Die Richtigkeit ist das Ausmaß, in dem der Mittelwert einer unendlichen Anzahl von Messungen einer Substanz mit der genauen Konzentration der vorhandenen Sub-stanz übereinstimmt. Die Bewertung der Richtigkeit erfordert somit eine exakte Defi-nition und Identifizierung der zu messenden Substanz (35); diese werden durch Methoden festgestellt, die von der gebrauchten Methode verschieden und unabhängig sind und die gleichen Parameter messen.

Für kleine Moleküle, die sich unzerstört verdampfen lassen, kann z. B. die Gaschromatographie – Massenspektrometrie angewandt werden.

– 2. Präzision

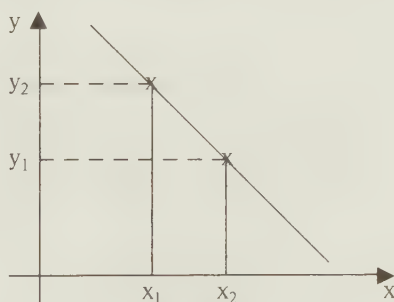
Die Präzision eines Radioimmunoassays gibt die Abweichung vom Mittelwert an und wird durch den Variationskoeffizienten V bestimmt.

Unter der Präzision eines Radioimmunoassays versteht man die Schwankung des Meßwertes des Antigens, die sich aus den zufälligen Fehlern, zu denen die statistischen Zählfehler gehören, den systematischen und den groben Zählfehlern zusammensetzt. Sie hängt von dem Meßfehler des markierten, gebundenen Antigens und von der Neigung der Standardkurve ab (47). Somit stellt λ den Index für die Präzision dar:

$$\lambda = \frac{\text{Neigung der Kurve}}{\text{Standardabweichung}}$$

Die Neigung einer Geraden in einem bestimmten Punkt errechnet sich nach dem Differentialquotienten:

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$



Bei einer Kurve ergibt sich die Neigung aus Berechnung der Neigung der Tangenten durch vielzählige Punkte der Kurve.

Die Schwankung ist bei konstanter Standardabweichung um so geringer, je steiler die Kurve verläuft.

Die Präzision der Messung bestimmt die Reproduzierbarkeit des Assays. Diese wird durch die Intra- und Interassay-Varianz charakterisiert.

a) Intraassay-Varianz

Aus einer Vielfachbestimmung einer Probe in einem Ansatz wird die Größe des zufälligen Fehlers bestimmt durch die Ermittlung des Variationskoeffizienten V [%] nach den folgenden drei Formeln:

1. Mittelwert	$\bar{x} =$	$\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$
2. Standardabweichung	$s =$	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$
3. Variationskoeffizient V [%]	$=$	$\frac{s \times 100}{\bar{x}}$

Da die Standardabweichung von der Größe des Mittelwertes abhängt, sind die errechneten Werte der verschiedenen Analysenverfahren nicht miteinander vergleichbar. Eine vergleichende Aussage dagegen ermöglicht die relative Standardabweichung $\hat{=}$ Variationskoeffizient, die die Standardabweichung in Relation zum Mittelwert angibt. Aus diesen Parametern ergeben sich die Bereiche $\bar{x} \pm 2s$ und $\bar{x} \pm 3s$, die 95,5 % bzw. 99,7 % aller Werte einschließen.

b) *Interassay-Varianz*

Die Berechnung der Interassay-Varianz erfolgt nach den obengenannten Formeln der Intraassay-Varianz.

Die Einzelwerte x_i ($i = 1 \dots n$) resultieren aus der Vielfachbestimmung einer Probe, z. B. eines Referenzserums, mit konstanter Hormonkonzentration in verschiedenen Analysenansätzen an unterschiedlichen Versuchstagen.

- 3. Assay-Parameter

a) *Gesamtaktivität*

Die Gesamtaktivität gibt die Radioaktivität des markierten Antigens an. Bei Verwendung im Radioimmunoassay ist zu beachten, daß die am Molekül gebundene Aktivität bei zunehmender Zeitdifferenz zwischen Markierungs- und Verwendungsdatum durch Autoradiolyse und radioaktiven Zerfall abnimmt und nicht mehr der Menge an ursprünglich markiertem Antigen entspricht.

b) *Nichtspezifische Bindung (P)*

Die nichtspezifische Bindung gibt den Leerwert des RIA's an, der sich aus der unspezifischen Adsorption des Tracers als Präzipitat an der Röhrchenwand und dem Zählerbackground zusammensetzt. In den Reaktionsansatz für die nichtspezifische Bindung (P) gehen somit nur das markierte Antigen (Tracer) und der Puffer ein.

Die nichtspezifische Bindung wird nach der Formel berechnet:

$$\text{nichtspezifische Bindung (P) [\%]} = \frac{\text{P in cpm}}{\text{Gesamtaktivität in cpm}} \times 100$$

c) *Spezifische Bindung B_o*

Die spezifische Bindung zeigt die Bindungsfähigkeit (Spezifität) des Antikörpers zum radioaktiv markierten Antigen an. Sie ist die Bedingung dafür, daß mit dem RIA tatsächlich das gesuchte Antigen gemessen wird. Dabei sollte der Antikörper sorgfältig auf die Vermeidung von Interferenzen – z. B. durch immunologische Kreuzreaktionen, Unreinheit des markierten Antigens, Interferenzen mit dem Inkubationsmittel – geprüft werden (47). Der Versuchsansatz der spezifischen Bindung enthält das markierte Antigen, den Antikörper und Puffer als Inkubationsmedium.

d) *Standardeichkurve*

Mit der Standardeichkurve werden die in cpm (counts per minute) angegebenen Meßwerte in Konzentrationsangaben des gesuchten Antigens, z. B. ng/l, übersetzt. Die Standardwerte der Kurve erhält man, indem konstanten Mengen von markiertem Antigen und Antikörper unmarkiertes Antigen in bekannten, aber verschiedenen hohen Konzentrationen zugefügt wird.

Die grafische Darstellung der Kurve erfolgt nach zwei Methoden (35) (siehe Abb. 5 und 6):

1. halblogarithmische Auftragung:

Abszisse: Konzentration des gesuchten, Antikörper-gebundenen, unmarkierten Antigens in $\log(x)$ [ng/l]

Ordinate: Antikörper-gebundenes, markiertes Antigen prozentual zur Gesamtaktivität = B/B_o [%]

2. logit-log-Auftragung:

Abszisse: wie in 1)

Ordinate: $\text{logit } B/B_o = a + b \times \log(x)$

a = Abschnitt der y-Achse

b = Steigung der Geraden

Gegenüber der halblogarithmischen Auftragung bringt die logit-log-Auftragung den Vorteil einer linearen Kurve mit sich (35).

Je steiler die Standardkurve verläuft, um so genauer können auch geringe Ag-Konzentrationsänderungen abgelesen werden (53).

Abbildung 5: Melatoninstandardkurve in halblogarithmischer Darstellung mit Vertrauensbereich (Mittelwerte $\bar{x} \pm 1$ Standardabweichung) (vgl. Tab. I).

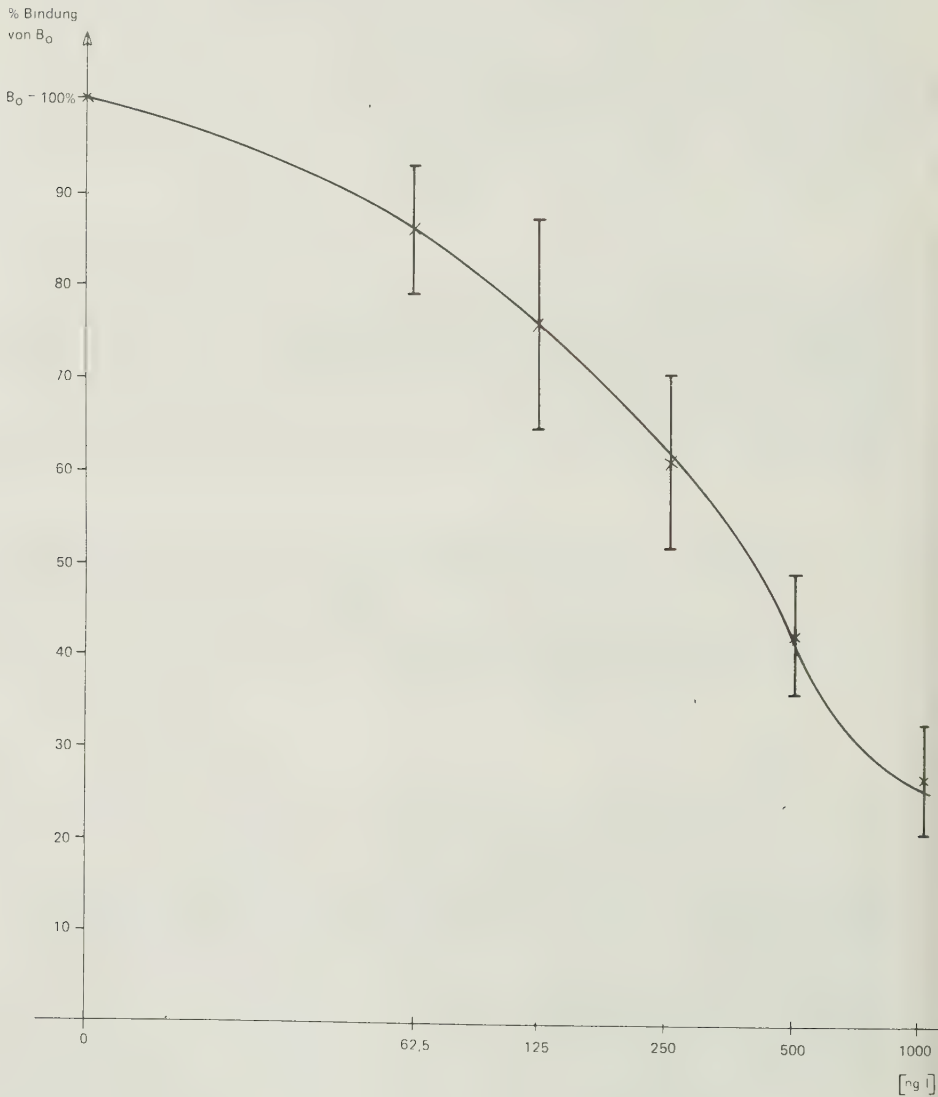
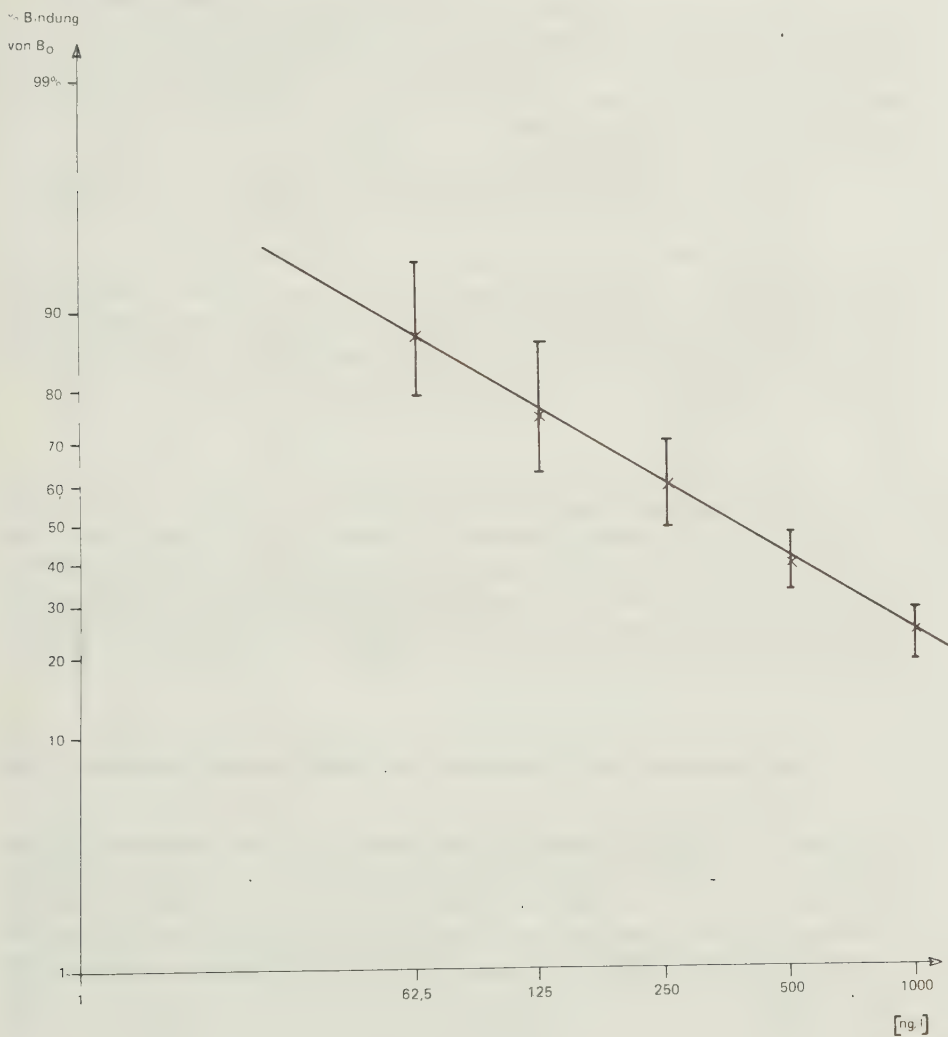


Abbildung 6: Melatoninstandardkurve in der logit-log-Darstellung mit Vertrauensbereich (Mittelwerte $\bar{x} \pm 1$ Standardabweichung) (vgl. Tab. I).



e) *Sensitivität*

Die Sensitivität eines RIA ist durch die untere Nachweisgrenze der Methode begrenzt. Diese entspricht der kleinsten Menge an Antigen, die mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit von einem verfügbaren Leerwert unterschieden werden kann. Sie hängt von der Bestimmung des Null-Punktes der Kurve (entspricht der B₀-Probe) und der Steigung der Standardkurve ab.

f) *Recovery = Wiederfindung des eingesetzten Hormons*

1) *„Kalte“ Recovery*

Die Wiederfindung einer bekannten Konzentration unmarkierten Hormons = „kalte“ Recovery wird durch die Bestimmung einer Probe mit konstanter, definierter Antigenkonzentration, wie z. B. Referenzserum oder Poolserum mit einer bestimmten Standardlösungskonzentration – 125 ng/l – festgelegt.

2) *„Heiße“ Recovery*

Die Wiederfindung von markiertem Hormon erhält man durch Bestimmung von Proben eines Analysenansatzes, denen eine definierte Menge radioaktiv markierten Antigens zugefügt wird und die lediglich extrahiert werden. Somit gibt die „heiße“ Recovery Auskunft darüber, wieviel von dem radioaktiv markierten Hormon im Analysenansatz verbleibt und in die radioimmunologische Bestimmung tatsächlich eingeht.

3. **Radioimmunologische Bestimmung von Melatonin nach Wetterberg et al. (65) mit dem KABI-Kit**

Die radioimmunologische Bestimmungsmethode von Melatonin nach Wetterberg (65) beruht erstens auf einer Extraktion von Melatonin aus dem Serum mit Hilfe von Methylenchlorid und zweitens einem Radioimmunoassay mit einem spezifischen Antikörper und einer Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen mit einer Ammoniumsulfatfällung des Ag-Ak-Komplexes. Das Ammoniumsulfat dient dem Aussalzen von unlöslichen Gamma-Globulinen bei einem bestimmten pH-Wert der Lösung.

3.1 *Erforderliche Reagenzien, Herstellung der Lösungen; Geräte*

Zur radioimmunologischen Bestimmung des Melatonins wurden die Reagenzien-sätze (Kits) der Firma AB KABI, Stockholm/Schweden, verwendet. Die dazugehörige Arbeitsanleitung umfaßte die Herstellung von Pufferlösungen, die Extraktion und den RIA (21).

I. Reagenzien, die im Kit enthalten sind (21):

1. Melatoninstandard

$8,61 \times 10^{-3}$ nmol (2 ng) / Röhrchen

Molekulargewicht: 232,26

Der lyophilisierte Standard wird mit 2 ml Aqua dest. aufgelöst. Es entsteht eine Standardlösung mit der Melatoninkonzentration von $4,31 \text{ nmol/l} = 1000 \text{ ng/l}$.

Eine Standardlösung mit der Hormonkonzentration von 2000 ng/l erhält man durch Auflösen des lyophilisierten Standards mit nur 1 ml Aqua dest.

Durch Verdünnen mit Phosphatsalzpuffer [II, 3], pH 7,5, wird die Standardreihe wie folgt erstellt:

Standardlösung	Puffer (ml)	Standardlösung (ml)	Konzentration (ng/l)
1.	–	–	1000 ng/l
2.	1 ml	1 ml von 1.	500 ng/l
3.	1 ml	1 ml von 2.	250 ng/l
4.	1 ml	1 ml von 3.	125 ng/l
5.	1 ml	1 ml von 4.	62,5 ng/l

2. ^3H -markiertes Melatonin (Tracer), New England Nuclear

Die spezifische Aktivität beträgt ca. 24 Ci/mmol .

Das lyophilisierte ^3H -markierte Melatonin wird zur sofortigen Verwendung mit 15 ml Aqua dest. aufgelöst.

3. Melatonin-Kaninchen-Antikörper, K 244

Der lyophilisierte Antikörper, der in einer Verdünnung von 1:6000 vorliegt, wird mit 15 ml Aqua dest. aufgelöst.

Die Endverdünnung des Antikörpers beträgt bei einem Inkubationsvolumen von 400 μl und einem Antikörpervolumen von 100 μl 1:24000.

4. Referenzserum

Das lyophilisierte Referenzserum wird mit 3 ml Aqua dest. aufgelöst. Es liegt somit in einer Konzentration von $0,86 \text{ nmol/l} = 200 \text{ ng/l}$ vor.

II. Reagenzien, die nicht im Kit enthalten sind

1. Phosphatpuffer: $0,05 \text{ mol/l}$, pH 7,0, 1000 ml

Basislösung: $0,50 \text{ mol/l}$ Natriumdihydrogenphosphat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$: 69 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ werden mit 900 ml Aqua dest. aufgelöst. Der pH-Wert wird mit 2 mol/l NaOH [5] auf 7,0 eingestellt. Danach wird die Lösung auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Von dieser Basislösung werden 100 ml entnommen und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird kontrolliert und gegebenenfalls mit 2 mol/l NaOH [5] auf pH 7,0 eingestellt. Der Puffer wird bei Kühlschranktemperatur (+2° C bis +8° C) aufbewahrt.

2. *Methylenchlorid = Dichlormethan CH_2Cl_2 zur Analyse*
gesättigt mit Phosphatpuffer [1], pH 7,0

3. *Phosphatsalzpuffer: 0,05 mol/l mit 0,1 % Gelatine, pH 7,5, 500 ml*

Die folgenden Reagenzien sind in annähernd 400 ml Aqua dest. aufzulösen:

3,45 g Natriumdihydrogenphosphat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

4,50 g Natriumchlorid NaCl

0,50 g Natriumazid NaN_3

0,50 g Gelatine

Der pH-Wert wird mit 2 mol/l NaOH [5] auf pH 7,5 eingestellt. Diese Lösung wird mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Der Phosphatsalzpuffer wird ebenfalls bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

4. *Gesättigtes Ammoniumsulfat: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$*

100 g Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ werden in 130 ml Aqua dest. aufgelöst. Die Lösung wird mit 0,5 ml 2 mol/l NaOH [5] neutralisiert, d.h. in einen pH-Wertbereich von 7,0 gebracht und mit Indikatorpapier kontrolliert. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

5. *Natriumhydroxid NaOH 2 mol/l, 100 ml*

8 g NaOH werden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

6. *Natriumhydroxid NaOH 0,1 mol/l, 100 ml*

0,4 g NaOH werden in 100 ml H_2O gelöst.

III. Reagenzien für die Modifikationen der radioimmunologischen Bestimmungsmethode

1. Phosphatpuffer 0,2 mol/l, pH 10, 1000 ml

2. Kaliumphosphatpuffer: 0,1 mol/l, pH 7,1

3. Melatonin-Schaf-Antikörper von Frau Arendt, Guildhay Antisera (4)

– *Laborgeräte*

1. Magnetrührer

2. Wasserstrahlpumpe

3. Pasteur-Pipetten

4. Warmwasserbad mit Temperatur bis 40°C
5. Schüttelapparat
6. Gekühlte Zentrifuge
7. Bohrlochkristall-Szintillationszähler
8. Eppendorf Probereagensdosierer (Fa. Eppendorf, Hamburg)
9. Eppendorf-Pipetten
10. Kühlschrank mit Innentemperatureinstellung von +2°C bis +8°C
11. Ellermann-Reagenzröhrchen 11 x 70 (Polystyrol, Greiner Nürtingen)

3.2 Extraktion

Die Extraktion, die der radioimmunologischen Bestimmung vorangeht, dient zur Ausschaltung von Melatoninmetaboliten, die zu Interferenzen im RIA führen können.

Die Extraktion von Melatonin aus Serum, Plasma und/oder Urin erfolgt mit Methylenchlorid [II,2], mit pH 7,0. In 10 ml Reagenzgläser wird der Probenansatz wie folgt zusammengestellt:

- 1,0 ml Serum, Plasma oder Urin
- 2,0 ml Phosphatpuffer [II,1] 0,05 mol/l, pH 7,0
- 5,0 ml Methylenchlorid [II,2]

Die Reagenzgläser werden verschraubt und mit einer Frequenz von 70/min während 15 min. geschüttelt. Anschließend werden die Proben während 10 min. bei einer Beschleunigung von ca. 700 x g bzw. 2000 rpm zentrifugiert.

Die wäßrige Phase des Probenansatzes wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zu dem verbleibenden Ansatz wird 1 ml NaOH 0,1 mol/l [II,6] zugefügt.

Die Proben werden nochmals während 15 min. mit einer Frequenz von 70/min. geschüttelt und anschließend während 10 min zentrifugiert (s.o.). Die wäßrige Phase wird abgesaugt. Dabei ist zu beachten, daß eine möglichst vollständige Entfernung der wäßrigen Phase erreicht wird, da zurückbleibendes NaOH im nachfolgenden RIA zu Störungen des pH-Milieus führt.

Das im Reagenzglas verbleibende Methylenchlorid wird mit Hilfe von Pasteur-Pipetten, deren Lumen mit silanisierter Glaswolle ausgefüllt ist, gefiltert und somit von möglichen Resten der wäßrigen Phase gereinigt. Die Reagenzgläser werden mit 0,5 ml Methylenchlorid nachgewaschen, welches ebenfalls gefiltert wird. In einem Wasserbad bei 37°C wird das abdampfende Methylenchlorid unter einem Druckluftstrom oder Stickstoffstrom abgeblasen. Der verbleibende Extrakt wird mit 0,5 ml Phosphatpuffer [II,3], pH 7,5, aufgelöst und in den RIA eingesetzt.

3.3 Radioimmunoassay

Die Inkubationsansätze des RIA's werden als Dreifachbestimmung in Ellermann-Röhrchen (11 x 70 mm Polystyrol, Greiner, Nürtingen) in der folgenden Reihenfolge aufgestellt:

- | | | |
|----|--|---|
| 1. | Gesamtaktivität = GA | 100 µl Tracer [I,2] |
| | Diese Proben durchlaufen nicht den RIA. Ihnen werden jeweils 200 µl NaOH 0,1 mol/l [II,6] und 200 µl H ₂ O zugefügt. Die Proben werden in mit 5 ml Rotiszint-Szintillationsflüssigkeit versehene Szintillationsgefäße gefüllt und im β -Zähler gezählt. | |
| 2. | Nichtspezifische Bindung
= P = Leerwert | 300 µl Phosphatsalzpuffer [II,3]
100 µl Tracer |
| 3. | Spezifische Bindung = B ₀ | 200 µl Phosphatsalzpuffer
100 µl Tracer
100 µl Antikörper [I,3] |
| 4. | Standardwerte: Proben
Nr. 1-5 | 100 µl Phosphatsalzpuffer
100 µl Standardlösung
Nr. 1-5 [I,1]
100 µl Tracer
100 µl Antikörper |
| 5. | Referenzserum | 100 µl Phosphatsalzpuffer
100 µl Referenzserum [I,4]
100 µl Tracer
100 µl Antikörper |
| 6. | Serum-, Plasma-, Urinproben | 100 µl Phosphatsalzpuffer
100 µl Probenextrakt
100 µl Tracer
100 µl Antikörper |

Bei erwarteten niedrigen Melatoninkonzentrationen der Proben empfiehlt es sich, ihr Volumen zu erhöhen:

Einerseits von 100 µl auf 200 µl, wobei das Volumen des Inkubationsansatzes von 400 µl durch Weglassen des Phosphatsalzpuffers beibehalten wird; andererseits besteht die Möglichkeit, das Probenvolumen auf 400 µl zu erhöhen (65, 21). Somit erhält man bei Weglassen des Puffers ein Reaktionsvolumen von 600 µl. Das Inkubationsvolumen der B₀- und Standardproben wird an 600 µl angeglichen, indem jeweils zusätzlich 200 µl Phosphatsalzpuffer zugefügt wird.

Die damit erhaltenen Melatoninwerte in cpm in % von B₀ auf der Ordinate der halb-logarithmischen graphischen Darstellung befinden sich auf der Standardkurve in einem annähernd linearen, steilen Abschnitt, wo die Streuung der gemessenen Standardwerte geringer ist als in den flachen Kurvenabschnitten. Die Ergebnisse fallen daher zuverlässiger aus.

Die Ellermann-Röhrchen werden verschlossen, vorsichtig geschüttelt und während 30 bis 60 min. bei einer Temperatur von 2-8°C inkubiert (siehe Kapitel 4.3.1).

Anschließend werden die Proben für einige Minuten in ein Eisbad gestellt; die Antigen-Antikörper-Komplexe jeder Probe werden dann mit 400 µl gesättigtem Ammoniumsulfat [II,4] ausgefällt bei einem Inkubationsvolumen von 600 µl wird das Ammoniumsulfatvolumen ebenso auf 600 µl erhöht; die Proben verbleiben dazu für weitere 60 min. im Eisbad. Dann werden sie während 10 min. bei einer Temperatur von +2° C bis +8° C und bei einer Beschleunigung von ca. 770 x g (2000 rpm) mit einer Rotorlänge von 26 cm und während weiterer 40 min. bei einer Beschleunigung 2400 x g (3000 rpm) zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes und Abtropfen der Röhrchen auf Filterpapier wird das auf dem Röhrchenboden befindliche Präzipitat mit 0,2 ml NaOH 0,1 mol/l [II,6] aufgelöst, vorsichtig geschüttelt und für einige Minuten in ein 37° C warmes Wasserbad gestellt. Nach Zufügen von 0,3 ml H₂O wird das aufgelöste Präzipitat in Szintillationsgefäße gegeben, die vorher mit Rotiszint-Szintillationsflüssigkeit versehen wurden. Die Szintillationsgefäße werden verschraubt, geschüttelt und zum Zählen der Radioaktivität in einen β-Zähler gestellt.

3.4 *Qualitätskontrolle*

In der Tab. XI sind die Parameter der Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Bestimmungen nach Wetterberg et al. (65, 21) im Vergleich mit denjenigen der Literatur (65) aufgeführt.

- *1. Richtigkeit*

Zur Bestimmung der Richtigkeit kann die „kalte“ Recovery verwendet werden, die sich aus der vielfältigen Messung eines Referenzserums mit einer bekannten Konzentration von 200 ng/l ergibt.

Die Richtigkeit beträgt 93,5 % des Ausgangswertes der bekannten Hormon-Konzentration (200 ng/l).

- *2. Präzision*

a) Intraassay-Varianz

Die Intraassay-Varianz-Proben werden erstellt, indem einer Vielzahl von Poolserumproben eine konstante Melatoninkonzentration von 125 ng/l zugefügt wird:

Die Bestimmung der Intraassay-Varianz ergibt gleichzeitig einen Meßwert für die „kalte“ Recovery. Die Intraassay-Varianz beträgt 38 % (siehe Tab. II).

b) Interassay-Varianz

Die Interassay-Varianz ergibt sich aus den Bestimmungen des Referenzserums, das in jedem der Analysenansätze an unterschiedlichen Versuchstagen enthalten ist [I,4] und beträgt 20 % (siehe Tab. III).

- 3. Assay-Parameter

a) Gesamtaktivität

Die Gesamtaktivität von 20 durchgeführten RIA's beträgt:

Mittelwert $\bar{x} = 1580$ cpm

Standardabweichung $s = 111,7$

Relative Standardabweichung = Variationskoeffizient $V = 7,06\%$

b) Nichtspezifische Bindung der Pufferprobe (P)

Die folgenden Werte wurden in allen 20 RIA's für die nichtspezifische Bindung P ermittelt (siehe Tab. II):

Mittelwert $\bar{x} = 8,27$ cpm

Standardabweichung $s = 1,86$

Variationskoeffizient $V = 22,5\%$

c) Spezifische Bindung B_o

Für die spezifische Bindung B_o in allen 20 RIA's ergeben sich die folgenden Werte (siehe Tab. I):

Mittelwert $\bar{x} = 35,5\%$ der Gesamtaktivität

Standardabweichung $s = 6,78$

Variationskoeffizient $V = 19\%$

d) Standardeichkurve

Die in 20 RIA's gemessenen Werte der Standardreihe werden in Prozent zu B_o angegeben, wenn $B_o = 100\%$ gesetzt wird. Sie sind aus der Tabelle I zu entnehmen.

Die grafische Darstellung der Standardeichkurve erfolgt durch das logit-log-Verfahren (siehe Kapitel 3.2) (Abb. 6). Neben den Mittelwerten der verschiedenen Standardkonzentrationsstufen wird jeweils die einfache Standardabweichung $\bar{x} \pm 1s$ aufgetragen, um einen Überblick über den Vertrauensbereich der Eichkurve zu geben (Abb. 6).

e) Sensitivität

Die Sensitivität wird aus der Standardkurve ermittelt, indem auf der Ordinate die zweifache Standardabweichung von B_o ($B_o \pm 2s$) addiert bzw. subtrahiert und auf die Kurve übertragen wird. Die entsprechenden Werte auf der Abszisse zeigen die unterste Nachweisgrenze an (35). Der Mittelwert der Sensitivität aller 20 durchgeführten RIA's beträgt $\bar{x} = 38$ ng/l (siehe Tab. V).

f) Recovery

1. Die „kalte“ Recovery ergibt sich zum einen aus der Bestimmung aller Referenzseren in einem Untersuchungsgang und beträgt $93,5\%$, und zum anderen aus den Werten der Poolserumproben mit einem bekannten Melatonin-zusatz von 125 ng/l. Dabei erhält man eine „kalte“ Recovery von 140% , wenn 125 ng/l = 100% (siehe Tab. II).

2. „Heiße“ Recovery-Proben, die aus einem Poolserum stammen, werden nach Zugabe einer bestimmten Menge an radioaktiv markiertem Hormon lediglich extrahiert. Zu 1 ml Serum werden 100 μl ^3H -markiertes Melatonin [I,2] (ca. $0,086 \times 10^{-3}$ nmol) hinzugefügt. Nach der Extraktion werden 100 μl des mit Phosphatsalzpuffer [II,3] aufgelösten Extraktes als Probe zusammen mit 200 μl 0,1 mol/l NaOH [II,6] und 200 μl H_2O in die mit 5 ml gefüllten Szintillationsgefäße gegeben und gezählt.

Für die „heiße“ Recovery nach der Wetterberg-Bestimmungsmethode (65, 21) ergibt sich ein Wert von $\bar{x} = 51,5\%$ der Gesamtaktivität mit einer Standardabweichung von $s = 13,5$ und einem Variationskoeffizienten von $V = 26,2\%$ (siehe Tab. IX).

4. Modifikationen der Melatoninbestimmung nach Wetterberg et al. (65)

Um eine Verbesserung der Sensitivität der Melatoninbestimmung zu erreichen, wird einerseits die Extraktion hinsichtlich verschiedener Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten modifiziert.

Andererseits wird der radioimmunologische Bestimmungsteil mittels der Inkubationskinetik mit unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen, verschiedener Trennungsverfahren und des Antikörpers nach Arendt (4) mit Zusatz von Rinder- γ -Globulin in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht und abgewandelt.

4.1 Herstellung der Lösungen, Reagenzien

1. Phosphatpuffer 0,2 mol/l, pH 10, 1000 ml [III,1]

27,6 g Natriumdihydrogenphosphat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ werden in 900 ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird mit 2 mol/l NaOH [II,5] auf pH 10 eingestellt. Der Puffer wird mit Kaliumchlorid gesättigt und bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

2. Kaliumphosphatpuffer: 0,1 mol/l, pH 7,1 [III,2]

mit 0,9 % Natriumchlorid NaCl
0,1 % Natriumazid NaN_2
0,1 % Gelatine

3. Melatonin-Schaf-Antikörper, Arendt, Guildhay Antisera [III,3] (4)

Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Frau Arendt, Guildford Surrey, Großbritannien, zur Verfügung gestellt.

Folgende spezifische Daten wurden aus einer persönlichen Mitteilung von Frau Arendt über den Antikörper entnommen (4):

Zur Herstellung des Antikörpers im Schafserum wurde das Immunogen N-Acetyl-5-Methoxy-Tryptophan-Thyroglobulin benötigt.

Die Kreuzreaktionen sind aus den folgenden Aufstellungen ersichtlich:

$$\% \text{ Kreuzreaktion} = \frac{\text{pg Melatonin}}{\text{pg Analogon}} = 100 \text{ bei } 50 \% \text{igen Anteilen}$$

6-Hydroxymelatonin	0,27
5-Methoxytryptophol	0,16
5-Methoxytryptophan	0,27
N-Acetylserotonin	0,016
5-Methoxytryptamin	0,135
5-Methoxyindolacetessigsäure	0,002
N-Acetyltryptamin	0,02
5-Hydroxyindolacetessigsäure	0,002
5-Hydroxytryptamin	0,002
5-Hydroxytryptophan	0,002
N-Acetyltryptophan	0,002

Im Versuch wird der Tracer mit der spezifischen Radioaktivität von 24 Ci/mmol Melatonin [I,1] verwendet. Der von Frau Arendt eingesetzte Tracer hat jedoch eine spezifische Radioaktivität von 36 Ci/mmol Melatonin.

Die Sensitivität beträgt in ihren Arbeiten 5-10 pg Melatonin/l; die spezifische Bindung bei einer Endverdünnung des Antikörpers von 1:24000 ca. 40 %. Der lyophilisierte Antikörper wird vor dem sofortigen Gebrauch mit 2,0 ml H₂O aufgelöst. Er liegt dann in einer Verdünnung von 1:10 vor. Die Gebrauchsverdünnung von 1:6000 wird durch Auffüllen des 2,0 ml Volumens auf 1200 ml mit Kaliumphosphatpuffer erreicht [III,2], pH 7,1.

Bei einem Inkubationsvolumen von 400 µl und dem Antikörpervolumen von 100 µl beträgt die Endverdünnung 1:24000.

4. *Aktivkohle [III,4]*

Die Aktivkohlesuspension besteht aus:

- 10,0 g Holzkohle
- 1,0 g Dextran T 70

Mit Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5, wird die Suspension eiskühlt auf ein Volumen von 400 ml aufgefüllt und mit einem Magnetrührer in Lösung gehalten.

4.2. **Extraktion**

4.2.1 *Extraktion nach Arendt (5)*

In 20 ml Zentrifugenröhrchen wird der Probenansatz aufgestellt:

- 1,0 ml Serum, Plasma oder Urin
- 0,75 ml Phosphatpuffer [III,1] pH 10
- 12,0 ml Methylenchlorid (Die Autoren verwandten Chloroform statt Methylenchlorid)

Die Proben werden während 10 min. bei einer Frequenz von 70/min. geschüttelt und anschließend bei 2000 rpm (ca. 700 x g) zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird abgesaugt. 10 ml der organischen Phase werden in saubere Reagenzgläser übertragen und in einem 37° C warmen Wasserbad unter einem Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wird in 1 ml Äthanol aufgelöst und ebenfalls mit Stickstoff in einem 37° C warmen Wasserbad abgeblasen.

Der Rückstand wird mit Kaliumphosphatpuffer [III,2], pH 7,1, aufgelöst. Die Lösung wird erneut mit 1 ml Petroleumäther extrahiert; die organische Phase wird abgesaugt, während die wäßrige Phase für den RIA benutzt wird.

a) *Extraktion mit „heißer“ Recovery*

Zum Vergleich der beiden Extraktionsverfahren werden Poolserumproben mit je 100 µl Tracer [I,2] extrahiert und wie unter Kapitel 3.4, 3f beschrieben behandelt.

Es werden 6 Versuchsgruppen aufgestellt:

1.	Arendt-Protokoll vollständig (5)	Mittelwert $\bar{x}$ = 1585 cpm ≅ 93 % der Totalaktivität
2.	Arendt-Protokoll mit 0,5 % Jodacetamid als eiweißausfällende + konservierende Komponente	Mittelwert $\bar{x}$ = 1396 cpm ≅ 82 % der Totalaktivität
3.	Arendt-Protokoll ohne zweite Extraktion mit Petroleumäther	Mittelwert $\bar{x}$ = 1513 cpm ≅ 89 % der Totalaktivität
4.	KABI-Protokoll vollständig (21)	Mittelwert $\bar{x}$ = 602 cpm ≅ 35,5 % der Totalaktivität
5.	KABI-Protokoll mit zwei Extraktionen mit Methylenchlorid	Mittelwert $\bar{x}$ = 744 cpm ≅ 44 % der Totalaktivität
6.	KABI-Protokoll mit 0,5 % Jodacetamid	Mittelwert $\bar{x}$ = 1229 cpm ≅ 72,5 % der Totalaktivität

Für die durch Extraktion nach der Arendt-Methode bestimmte „heiße“ Recovery ergibt sich somit $\bar{x}$ = 87 % der Totalaktivität (Versuchsgruppen 1 und 2) (siehe Tab. IX).

b) *Extraktion und RIA mit Poolserum und Intraassay-Varianz-Proben*

Proben aus Poolserum werden in vier Versuchsgruppen aufgeteilt, nach der Arendt-Methode extrahiert und im RIA bestimmt:

1. 5 Proben – Poolserum
Ergebnisse außerhalb des Meßbereiches

2. 5 Proben - Poolserum mit Melatoninstandard 125 ng/l
Die Ergebnisse dieser Versuchsgruppe werden als Intraassay-Varianz der Arendt-Methode gewertet (siehe Tab. II):
Mittelwert $\bar{x} = 14,4$ ng/l
Standardabweichung $s = 4,17$
Variationskoeffizient $V = 29\%$
Unter der Voraussetzung, daß $125 \text{ ng/l} \triangleq 100\%$, beträgt somit die „kalte“ Recovery 11,5 %
3. 5 Proben - Poolserum ohne zweite Extraktion mit Petroleumäther: Ergebnisse außerhalb des Meßbereiches
4. 5 Proben - Poolserum mit Melatoninstandard 125 ng/l ohne zweite Extraktion mit Petroleumäther
Mittelwert $\bar{x} = 23$ ng/l
Standardabweichung $s = 2,2$
Variationskoeffizient $V = 9,5\%$

4.2.2 Extraktion teils nach Arendt (5) teils nach Wetterberg (65, 21)

Unter Berücksichtigung des aufwendigen Extraktionsarbeitsganges nach Arendt (5) aber auch der günstigen Ergebnisse wird das Extraktionsverfahren nach Arendt mit der Anleitung von Wetterberg et al. (65, 21) kombiniert.

Der Analysenansatz besteht aus:

- 1,0 ml Serum, Plasma oder Urin
- 2,0 ml Phosphatpuffer [III,1], pH 10
- 5,0 ml Methylenchlorid

Von dem Arendt-Verfahren wird lediglich der Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 10 übernommen. Die übrige Extraktion erfolgt nach Wetterberg et al. (65, 21). Die Versuche zur Qualitätskontrolle betreffen nur diejenigen Parameter, die von der Extraktion beeinflußt werden. Somit entsprechen die Werte für die Gesamtkativität, die nichtspezifische Bindung und die spezifische Bindung und diejenigen der Standardkurve denjenigen, die mit der KABI-Methode ermittelt werden, da sie nur in den RIA eingehen.

- Intraassay-Varianz

Poolserumproben mit einem Melatoninkonzentrationszusatz von 125 ng/l und 250 ng/l werden jeweils 15- bzw. 13fach bestimmt. Die Werte sind der Tab. II zu entnehmen.

Die Intraassay-Varianz beträgt

$V = 22\%$ bzw. 19% (für 125 ng/l) bzw.

$V = 33\%$ (für 250 ng/l)

- *Interassay-Varianz*

Die Interassay-Varianz ergibt sich aus der 8fachen Bestimmung des Referenzserums an unterschiedlichen Versuchstagen und hat einen Wert von

$V = 26\%$ (siehe Tab. III).

- *„Kalte“ Recovery*

Die Meßwerte des Referenzserums sind aus der Tabelle III ersichtlich:

Mittelwert $\bar{x} = 205 \text{ ng/l}$.

Somit errechnet sich eine „kalte“ Recovery von 102,5 %, da die definierte Konzentration des Referenzserums 200 ng/l beträgt.

Aus den Werten der Intraassay-Varianz mit Melatoninstandard von 125 ng/l bzw. 250 ng/l ergibt sich eine „kalte“ Recovery von 69,2 % bzw. 87,6 % (siehe Tab. II).

- *„Heiße“ Recovery (siehe Kap. 3.4, 3f)*

Aus der Tabelle IX sind die Werte der „heißen“ Recovery zu entnehmen. Der Mittelwert beträgt $\bar{x} = 69,2\%$ der Gesamtaktivität.

Standardabweichung $s = 7,8$

Variationskoeffizient $V = 11,3$

- *„Überstandskontrolle“*

Das nach dem ersten Extraktionsvorgang – d.h. nach dem ersten Schütteln und Zentrifugieren des Ansatzes – in der wäßrigen, abzusaugenden Phase verbleibende, radioaktiv markierte Melatonin wird gemessen und mit der „heißen“ Recovery verglichen. Aus den 2 ml des wäßrigen Überstandes werden 100 µl als Probe entnommen und wie die Proben der Gesamtaktivität und der „heißen“ Recovery behandelt und gezählt (siehe Kapitel 3.4.1, 3f – 200 µl 0,1 mol/l NaOH [II,6] und 200 µl H₂O in mit 5 ml Rotiszint versehene Zählröhrchen).

Der Überstand enthält eine Radioaktivität von

$\bar{x} = 655 \text{ cpm} \hat{=} 37\%$ der Gesamtaktivität

Standardabweichung $s = 1,16$

Variationskoeffizient $V = 2,5\%$

- *„Extraktverdünnungskurve“*

Lyophilisierter Melatoninstandard mit einer Konzentration von 1000 ng/l [I,1] wird anstatt mit 2 ml H₂O mit 2 ml Poolserum aufgelöst und extrahiert. Der Extrakt wird in 1,0 ml Phosphatsalzpuffer [II,3] aufgelöst und in einer der Standardkonzentration entsprechenden Reihenfolge verdünnt:

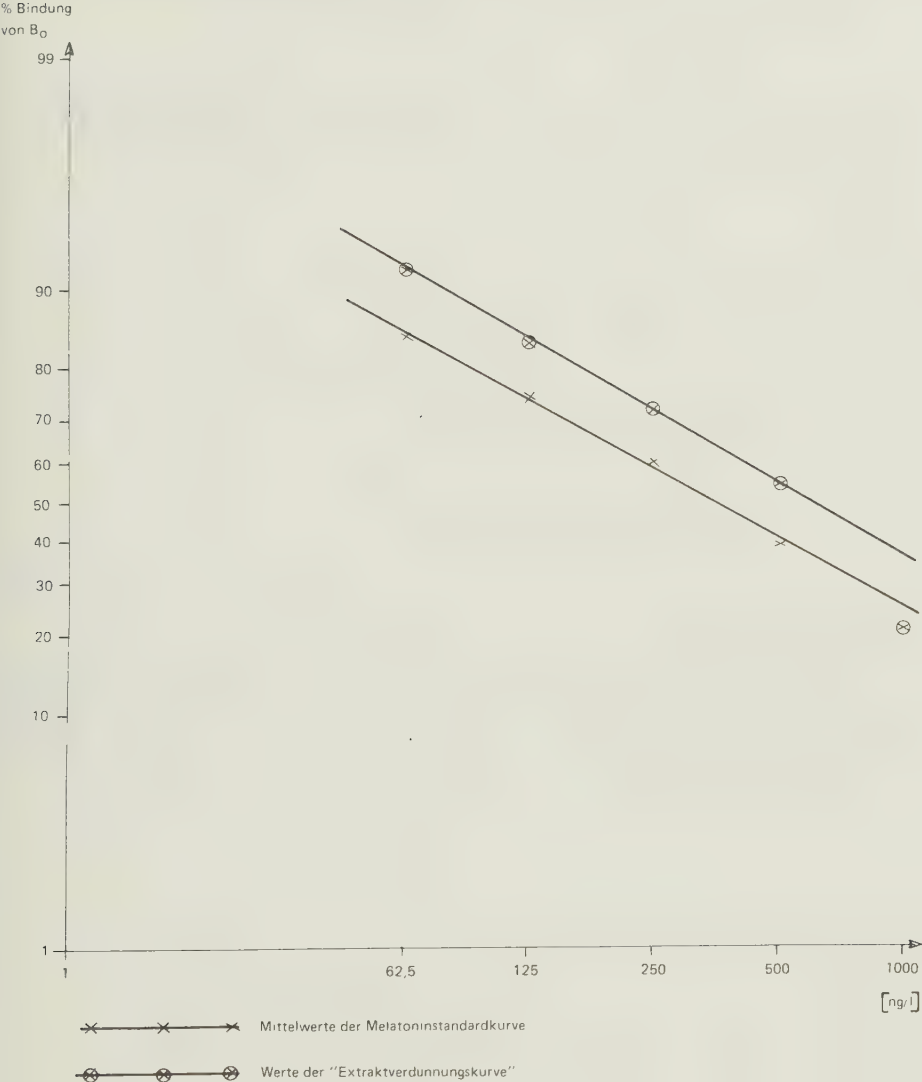
Extrakt	Puffer	Extraktlösung	erwartete Konzentration
1.	–	–	1000 ng/l
2.	0,5 ml	0,5 ml von Nr. 1	500 ng/l
3.	0,5 ml	0,5 ml von Nr. 2	250 ng/l
4.	0,5 ml	0,5 ml von Nr. 3	125 ng/l
5.	0,5 ml	0,5 ml von Nr. 4	62,5 ng/l

Die Extraktproben mit der absteigenden Konzentrationsreihe werden im RIA bestimmt, um ein weiteres Kriterium für die „kalte“ Recovery und für das Verhalten der Proben mit einer der Standardreihe entsprechenden Konzentration zu erhalten; sie werden mit den jeweiligen Mittelwerten der Standardkurve verglichen:

	Standardkurve	Extraktverdünnungskurve
62,5 ng/l	85,6 % von B_0	92 % von B_0
125 ng/l	76,1 % von B_0	84 % von B_0
250 ng/l	60,8 % von B_0	74 % von B_0
500 ng/l	40,8 % von B_0	58 % von B_0
1000 ng/l	26,8 % von B_0	20 % von B_0

Die Extraktverdünnungskurve verläuft in der grafischen Darstellung nach dem logit-log-Verfahren (siehe Abb. 7) annähernd parallel, oberhalb der Standardkurve. Eine lineare Konzentrationszunahme entsprechend der Standardhormonzugabe ist damit nachweisbar.

Abbildung 7: „Extraktverdünnungskurve“ – mit Poolserum aufgelöster Melatoninstandard wird extrahiert und in einer den Standardwerten entsprechenden Reihenfolge verdünnt und mit der eigentlichen Melatoninstandardkurve verglichen.



4.3 *Modifikationen der radioimmunologischen Bestimmung*

Diesen Modifikationsversuchen wird die Extraktion der Proben teils nach Wetterberg (65, 21) und teils nach Arendt (5) vorangestellt (Kap. 4.2.2).

4.3.1 *Inkubationskinetik*

Die Inkubationszeit und –temperatur der Reaktionspartner – markiertes Antigen und Antikörper – werden zur Erreichung einer günstigeren spezifischen Bindung B_0 in 2 Versuchen mit B_0 -Proben bestimmt:

Versuch I:

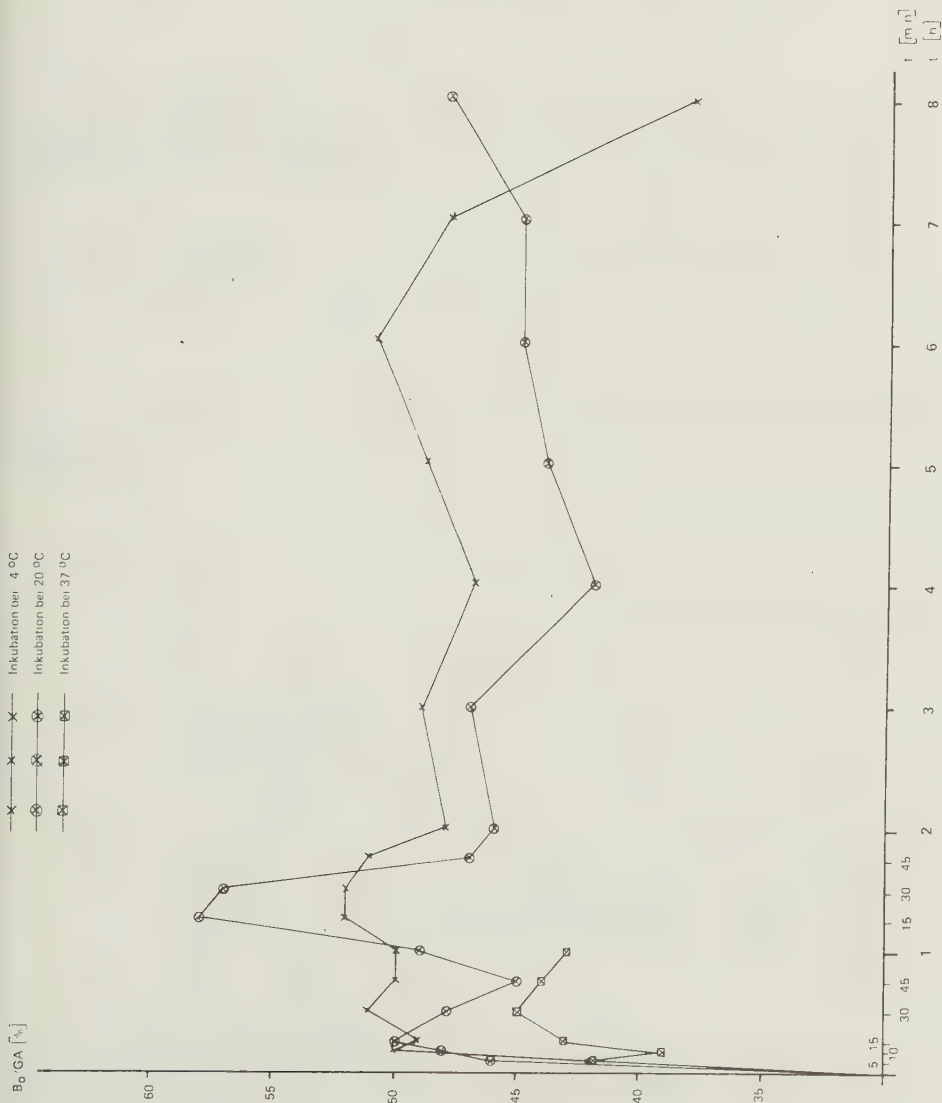
1. Gruppe: Inkubation während 8 Stunden bei 4°C
100 µl Antikörper [I,3] zugefügt nach:
5', 10', 15', 30', 45', 1 h, 2 h, 3 h ... 8 h
2. Gruppe: Inkubation während 8 Stunden bei 20°C
100 µl Antikörper zugefügt nach:
5', 10', 15', 30', 45', 1 h, 2 h, 3 h ... 8 h
3. Gruppe: Inkubation während 1 Stunde bei 37°C
100 µl Antikörper zugefügt nach:
5', 10', 15', 30', 45', 60'

Die Ergebnisse sind in der Tabelle IV aufgezeichnet, die entsprechenden Kurven befinden sich in der Abb. 8.

Das Reaktionsgleichgewicht wird bei allen Inkubationstemperaturen gleich schnell nach maximal 15 min. erreicht. Dabei zeigt die Kurve der Inkubationstemperatur 4°C den gleichmäßigsten Verlauf.

Die günstigste spezifische Bindung bei $B_0 \leq 50\%$ wird mit der Inkubation bei 4°C auch am ehesten erreicht.

Abbildung 8: Inkubationskinetik während 1-8 Stunden mit Proben der spezifischen Bindung (s. Tab. IV)

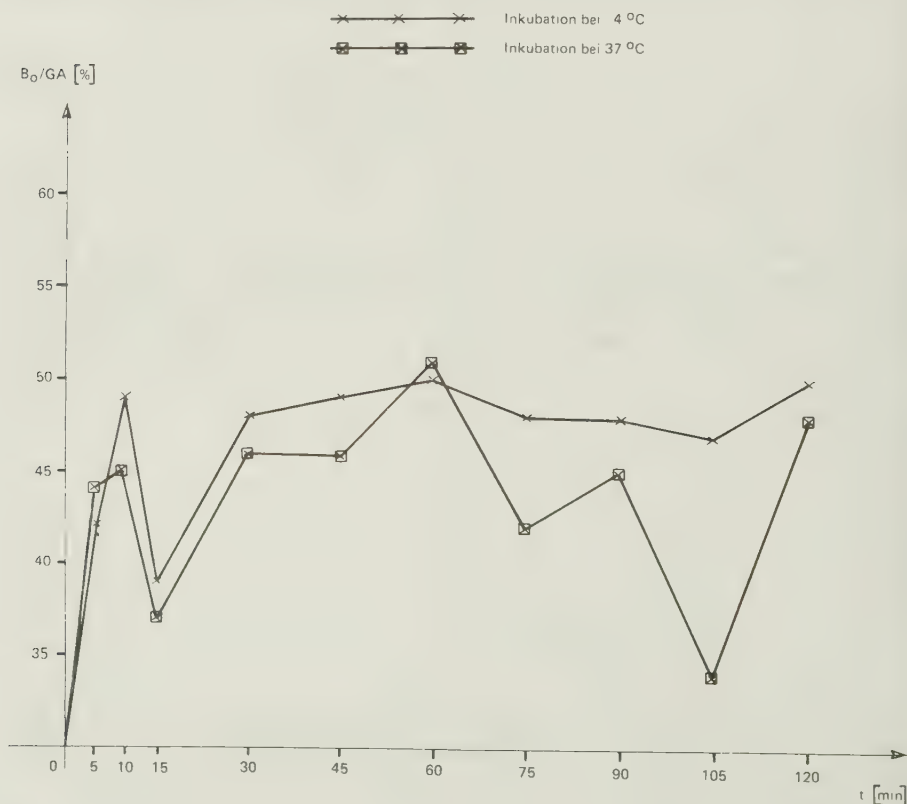


Versuch II:

1. Gruppe: Inkubation während 2 Stunden bei 37°C:
100 µl Antikörper [I,3] zugefügt nach:
5', 10', 15', 30', 45', 60', 75', 90', 105', 120'
2. Gruppe: Inkubation während 2 Stunden bei 4°C:
100 µl Antikörper zugefügt nach:
5', 10', 15', 30', 45', 60', 75', 90', 105', 120'

Die Ergebnisse sind aus der Tab. IV zu entnehmen, die entsprechenden grafischen Darstellungen aus der Abb. 9. Auch bei diesem Vergleich zwischen den Inkubationstemperaturen von 37°C und 4°C zeigt die 4°C-Kurve einen gleichmäßigeren Verlauf; außerdem erreicht sie schneller – bereits nach 10 min. – einen optimalen B_0 -Werte von 48 %.

Abbildung 9: Inkubationskinetik während 2 Stunden mit Proben der spezifischen Bindung (s. Tab. IV)



4.3.2 Trennungungsverfahren

Verschiedene Trennungungsverfahren – das nochmalige Aussalzen mit Ammoniumsulfat, die Verwendung eines zweiten, gegen den ersten, antigenspezifischen Antikörper gerichteten Antikörper zur Vergrößerung des Ag-Ak-Komplexes und die Absorption des nichtgebundenen Antigens an Aktivkohle, die an Dextran oder Albumin gebunden ist – werden untersucht.

4.3.2.1 Nachwaschen mit Ammoniumsulfat

Das Dekantieren des Überstandes, der sich nach der Trennung mit Ammoniumsulfat neben dem abgesunkenen Präzipitat bildet, kann zu Unregelmäßigkeiten der Ergebnisse führen, da nach Abschütten des Überstandes nichtgebundenes Antigen in gelöstem Zustand in Tropfenform an der Röhrcheninnenwand haftet (79).

Das Nachwaschen mit Ammoniumsulfat soll daher bezwecken, den Gehalt an gelöstem, nichtgebundenen Antigen im verbleibenden Überstand oder an der Röhrcheninnenwand zu verringern.

Es werden Poolserumproben mit einer konstanten Melatoninstandardkonzentration von 125 ng/l verwendet. Die Melatoninkonzentration des Poolserums ohne Standardhormonzusatz beträgt weniger als 10 ng/l und liegt somit unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Proben werden in drei Versuchsgruppen aufgeteilt:

1. Gruppe: Einmaliges Aussalzen mit Ammoniumsulfat:

Anstelle des Dekantierens wird der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe unter Zurücklassen eines bestimmten, gleichbleibenden Restes von ca. 5 mm im Probenröhrchen abgesaugt. Das Präzipitat wird gemäß der Methode (siehe Kap. 3.) weiterbehandelt.

Mittelwert $\bar{x}$ 78 ng/l

Standardabweichung s = 45

Variationskoeffizient V = 57 %

„kalte“ Recovery = 62 %, wenn 125 ng/l $\triangleq$ 100 %

2. Gruppe: Der Überstand der Proben wird dekantiert, die Probenröhrchen werden auf Filterpapier abgetropft. Nach dem Nachwaschen mit 1,0 ml gesättigtem Ammoniumsulfat und Zentrifugieren bei 2400 x g = 3000 rpm wird erneut der Überstand dekantiert und das Präzipitat gemäß der Methode (Kap. 3.) weiterbehandelt.

Mittelwert $\bar{x}$ 34 ng/l

Standardabweichung s = 60

Variationskoeffizient V = 17 %

„kalte“ Recovery = 27 %, wenn 125 ng/l $\triangleq$ 100 %

3. Gruppe: Die Proben dieser Gruppe werden wie diejenigen der Gruppe 2 behandelt. Jedoch wird zum Nachwaschen 1,0 ml 50 %ig gesättigtes Ammoniumsulfat benutzt.

Mittelwert $\bar{x}$ 128 ng/l

Standardabweichung $s = 46$

Variationskoeffizient $V = 35 \%$

„kalte“ Recovery = 102 %, wenn 125 ng/l $\triangleq$ 100 %

zum einmaliges Dekantieren und Abtropfen auf Filterpapier ohne Nach-
Vergleich: waschen mit Ammoniumsulfat (siehe Kap. 3.4, 3f 1, Tab. II):

Mittelwert $\bar{x}$ 176 ng/l

Standardabweichung $s = 67$

Variationskoeffizient $V = 38 \%$

„kalte“ Recovery = 140,8 %, wenn 125 ng/l $\triangleq$ 100 %

Die „kalte“ Recovery erreicht bei einmaligem Dekantieren und Abtropfen auf Filterpapier mit 176 ng/l und 140,8 % den höchsten Wert. Darauf folgt die „kalte“ Recovery der Versuchsgruppe 3 (Nachwaschen mit 50 %ig gestättigtem Ammoniumsulfat, Abtropfen auf Filterpapier) mit 128 ng/l bzw. 102,4 %. Die „kalte“ Recovery der ersten beiden Versuchsgruppen fällt mit 62 und 27 % sehr niedrig aus.

4.3.2.2 Doppelantikörper

Der Doppelantikörper wird anhand des Leerwertes P, der spezifischen Bindung B_o , der Melatoninstandardkurve und einer Referenzserumprobe getestet.

Antikörper I $\triangleq$ Antigen-spezifischer Antikörper K 244 [1,3]

Antikörper II $\triangleq$ gegen Kaninchen-Gamma-Globulin gerichteter Antikörper als Doppelantikörper

Leerwert P = 200 μ l Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5
(3fach) 100 μ l Kaninchennormalserum, 1 %

spezifische Bindung B_o = 100 μ l Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5
(3fach) 100 μ l Kaninchennormalserum, 1 %
100 μ l Antikörper I

Standardproben = 100 μ l Kaninchennormalserum, 1 %
Nr. 1-5 100 μ l Standardlösung, Nr. 1-4 [I,1]
(3fach) 100 μ l Antikörper I

Referenzserum = 100 μ l Kaninchennormalserum, 1 %
(3fach) 100 μ l Referenzserum [I,4]
100 μ l Antikörper I

Die Proben werden bei 37°C während 60 min. „kalt“ vorinkubiert, anschließend werden 100 μ l Tracer [I,2] zugefügt, und die Proben durchlaufen dann die „heiße“ Inkubation während weiterer 60 min. bei 37°C. Danach erhalten die Proben

jeweils 100 μ l Antikörper II und werden für 18 bis 24 Stunden bei Kühlschranktemperatur (+2° C bis +8° C) aufbewahrt. Nach Zentrifugieren während 30 min. bei 2400 x g $\hat{=}$ ca. 3000 rpm (Rotorlänge 26 cm) erhalten die Proben 2,0 ml Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5, um das Volumen des Überstandes, der das nichtgebundene Antigen enthält, zu vergrößern. Hierdurch soll beim Absaugen des Überstandes die Menge an zurückbleibendem nichtgebundenem Antigen möglichst gering gehalten werden. Nach Absaugen des Überstandes wird das Präzipitat, bestehend aus dem Antigen-AntikörperI-AntikörperII-Komplex, wie oben beschrieben (siehe Kap. 3.4., 2f) behandelt (200 μ l 0,1 mol/l NaOH [II,6] und 300 μ l H₂O).

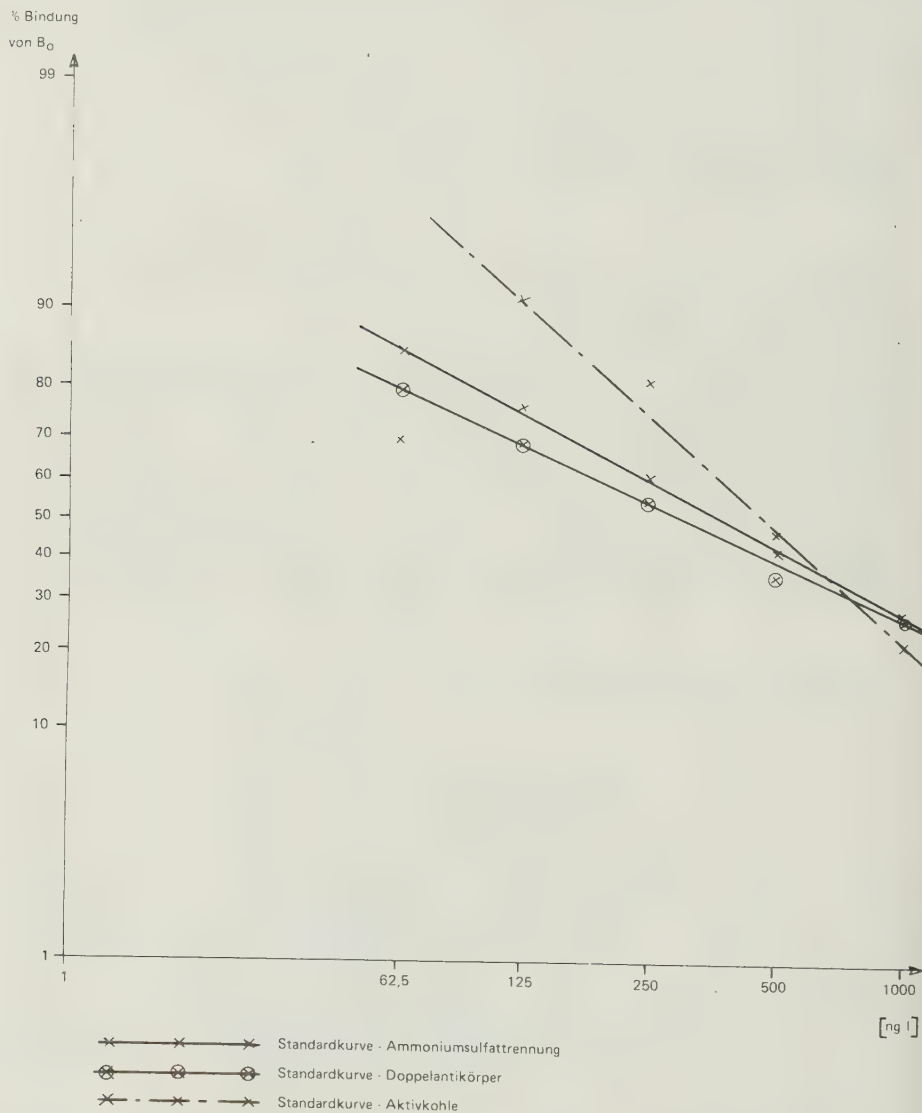
Die Ergebnisse werden mit denjenigen des Ammoniumsulfattrennungsverfahrens verglichen und sind aus der Tabelle X zu entnehmen.

Die grafische Darstellung der Standardkurven, die nach den beiden Trennungsverfahren hergestellt wurden, befinden sich in der Abb. 10.

Die Standardkurve, die nach dem Trennungsverfahren mit dem Doppelantikörper erstellt wurde, zeigt einen insgesamt flacheren Verlauf im Vergleich zur Ammoniumsulfattrennung; die spezifische Bindung B_0 der Doppelantikörper-Methode ist um ca. 10 % niedriger als die B_0 -Probe mit Ammoniumsulfat.

Insgesamt sind die Prozentbindungswerte von B_0 der Standardkurve um 5 bis 10 % niedriger als die Standardwerte mit Ammoniumsulfat. Die „kalte“ Recovery, die sich aus der Bestimmung des Referenzserums ergibt, beträgt mit der Doppelantikörper-Methode 80 % im Vergleich zu 93 % der Ammoniumsulfatmethode.

Abbildung 10: Melatoninstandardkurve bei Verwendung unterschiedlicher Trennungsv Verfahren in Radioimmunoassay (vgl. Tab. X):
 - Ammoniumsulfat, Doppelantikörper, Aktivkohle -



4.3.2.3 Aktivkohle

Die Trennungseigenschaften der Aktivkohle [III,4] werden mittels eines Leerwertes P, der spezifischen Bindung B_0 und einer Melatoninstandardkurve untersucht.

Leerwert P (3fach)	= 300 μ l Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5
spez. Bindung B_0 (3fach)	= 200 μ l Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5 100 μ l Antikörper [I,3]
Standardproben	= 100 μ l Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5
Nr. 1-5 (3fach)	100 μ l Standardlösung Nr. 1-5 [I,1] 100 μ l Antikörper [I,3]

Nach 60 min. „kalter“ Vorinkubation mit Phosphatsalzpuffer [II,3], Antikörper [I,3] und Standardlösung [I,1] bei 37°C werden jeweils 100 μ l Tracer [I,2] zugefügt. Die „heiße“ Inkubationszeit bei 37°C beträgt ebenfalls 60 min. Anschließend erhalten die Proben 2,0 ml eisgekühlte Aktivkohle und verbleiben weitere 10 min. im Eisbad. Nach Zentrifugieren bei $2400 \times g \approx$ ca. 3000 rpm bei einer Rotorlänge von 26 cm während 30 min. wird der Überstand in mit 5,0 ml Rotisint-Szintillationsflüssigkeit versehene Zählröhrchen geschüttet, nachdem er wie in Kap. 3.4, 3f beschrieben, vorher behandelt worden ist – 200 μ l 0,1 mol/l NaOH [II,6] und 300 μ l H_2O – und gezählt.

Die Ergebnisse sind in Form einer Gegenüberstellung mit dem Ammoniumsulfat-Trennungverfahren in der Tabelle X aufgeführt. Die entsprechende Standardkurve ist aus der Abb. 10 zu entnehmen.

Die spezifische Bindung B_0 fällt mit 3,46 % von GA (Gesamtaktivität) so niedrig aus, daß keine Aussage über ein charakteristisches Bindungsverhalten des Antikörpers K 244 [I,3] möglich ist.

Die mit der Aktivkohle erstellte Standardkurve hat einen sehr unregelmäßigen Verlauf.

4.3.3 Arendt-Antikörper (77)

Zur weiteren Optimierung des Radioimmunoassays von Melatonin wurde der Antikörper nach Arendt [III,3] eingesetzt und mit dem KABI-Antikörper verglichen. Lediglich den mit dem Arendt-Antikörper zu bestimmenden Proben wird Rinder- γ -Globulin zugesetzt, das eine Vergrößerung des Ag-Ak-Komplexes in Form eines zweiten Antikörpers bewirken und somit die Präzipitatbildung verstärken soll (66).

4.3.3.1 Spezifische Bindung B_0

– Verschiedene Konzentrationen des Rinder- γ -Globulins

Die Konzentrationen des Rinder- γ -Globulins werden durch Verdünnen mit dem Kaliumphosphatpuffer [III,3], pH 7,1, in folgenden Stufen hergestellt:

5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml.

Die B₀-Proben mit dem Arendt-Antikörper enthalten:

100 µl Kaliumphosphatpuffer [III,3], pH 7,1

100 µl Rinder-γ-Globulin, jeweils in der Verdünnungsstufe von 5 bis 0,0625 mg/l

100 µl Tracer [I,2]

100 µl Arendt-Antikörper [III,3]

Rinder-γ-Globulin = 5	mg/ml: B ₀ = 30,2 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 4	mg/ml: B ₀ = 32,9 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 3	mg/ml: B ₀ = 32,0 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 2	mg/ml: B ₀ = 23,2 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 1	mg/ml: B ₀ = 30,3 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 0,5	mg/ml: B ₀ = 29,6 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 0,25	mg/ml: B ₀ = 28,4 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 0,125	mg/ml: B ₀ = 27,7 % der Gesamtaktivität
Rinder-γ-Globulin = 0,0625	mg/ml: B ₀ = 29,5 % der Gesamtaktivität

In den folgenden Versuchen mit dem Arendt-Antikörper erhalten die B₀-Proben Rinder-γ-Globulin mit einer Konzentration von 4 mg/ml, da sich hierbei der günstigste B₀-Wert ergibt.

Die B₀-Probe mit dem KABI-Antikörper:

200 µl Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5,

100 µl Tracer [I,2]

100 µl KABI-Antikörper [I,3]

ergibt B₀ = 49,7 % der Gesamtaktivität.

- Inkubationskinetik

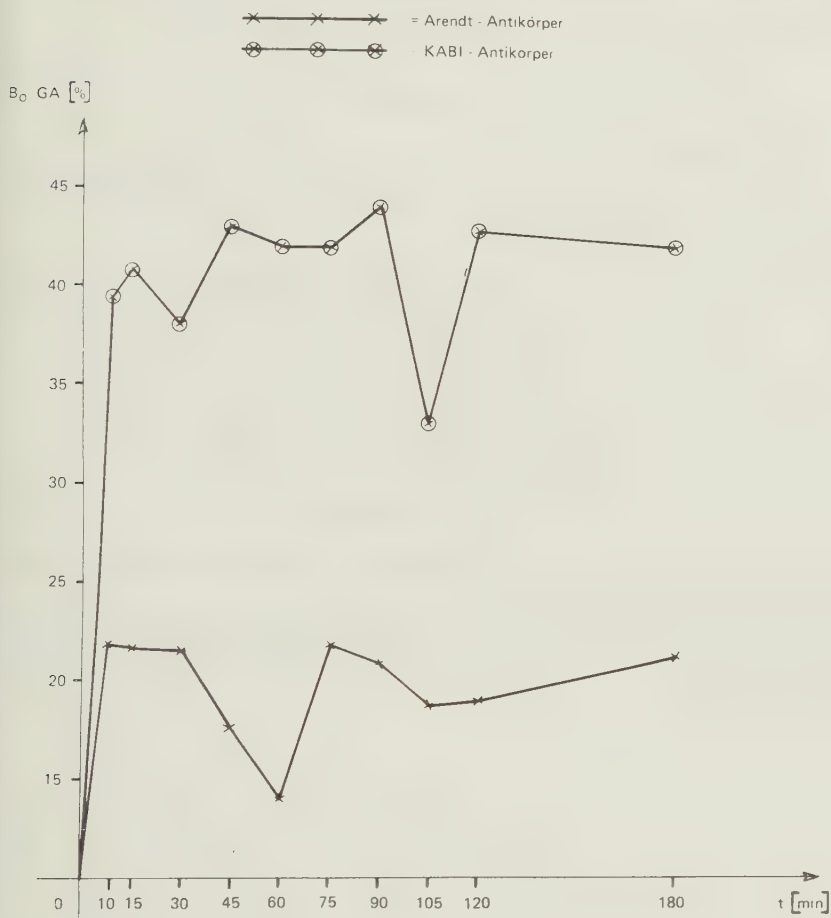
Die Inkubationstemperatur beträgt 4°C (siehe Kap. 4.3.1), die Inkubationszeiten werden folgendermaßen gewählt:

10', 15', 30', 45', 60', 75', 90', 105', 120', 3h.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle VI und in der Abbildung 11 dargestellt. Die mit dem Arendt-Antikörper inkubierten Proben haben eine spezifische Bindung B₀ zwischen 14,8 und 21,7 % innerhalb der Inkubationszeit von 3 Stunden.

Die spezifische Bindung B₀ der mit dem KABI-Antikörper inkubierten Proben erreicht bereits nach 10 min. 39,5 % und hat bei 90 min. mit 44 % den höchsten Wert.

Abbildung 11: Vergleich zwischen KABI - Antikörper und Arendt - Antikörper anhand einer Inkubationskinetik während 3 Stunden mit Proben der spezifischen Bindung B_0 (Vgl. Tab. VI):



Arendt-Antikörper-Gebrauchsverdünnung 1:600

Anstelle mit der Gebrauchsverdünnung 1:6000 wird der ArendtAntikörper mit der Verdünnung 1:600 getestet, was einer Endverdünnung im RIA von 1:2400 entspricht (siehe Kap. 4.1 [III,3]).

Die Verdünnung erhält man durch Auffüllen von 100 μl der Verdünnung 1:10 auf ein Volumen von 6 ml mit Kaliumphosphatpuffer, pH 7,1 [III,2].

Die spezifische Bindung B_0 mit dem Arendt-Ak in der Verdünnung 1:600 mit der Rinder- γ -Globulin-Konzentration von 3 mg/ml bzw. 4 mg/ml beträgt
 $\bar{x} = 69,2\%$ der Gesamtaktivität bzw.
 $\bar{x} = 71,6\%$ der Gesamtaktivität

4.3.3.2 Melatoninstandardkurve und Serumproben

- Melatoninstandardkurve

Die Standardkurven werden in der in Kap. 3.1 [I,1] beschriebenen Weise hergestellt.

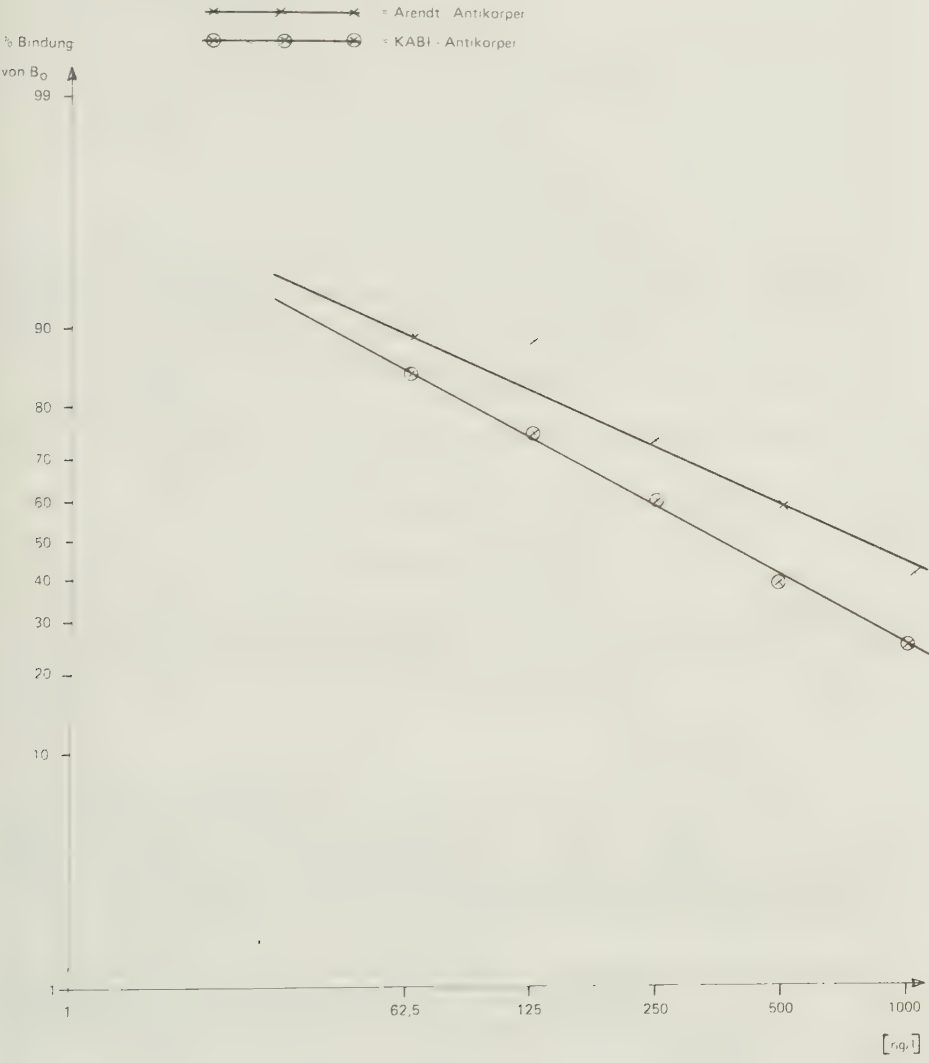
Die Standardproben bestehen aus:

1. Standardproben Nr. 1-5: 100 μ l Rinder- γ -Globulin, 4 mg/ml
 (3fach) 100 μ l Standardprobe Nr. 1-5 [I,1]
 100 μ l Tracer [I,2]
 100 μ l Arendt-Antikörper [III,3]
2. Standardproben Nr. 1-5: 100 μ l Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5
 100 μ l Standardproben Nr. 1-5 [I,1]
 100 μ l Tracer [I,2]
 100 μ l KABI-Antikörper [I,3]

Die Werte der Standardkurven sind der Tabelle VII zu entnehmen, ihre grafischen Darstellungen befinden sich in der Abb. 12.

Die Standardkurve der Arendt-Antikörper-Proben zeigt einen sehr flachen Verlauf. Die spezifische Bindung für den Arendt-Antikörper beträgt 24%, diejenige für den KABI-Antikörper 40%.

Abbildung 12: Vergleich zwischen KABI - Antikörper und Arendt - Antikörper anhand von Melatonin-
standardkurven (vgl. Tab. VII):



- Referenzserum

Zur Extraktion werden 2,0 ml des Referenzserums [I,4] eingesetzt. Der Extrakt derjenigen Proben, die mit dem Arendt-Antikörper bestimmt werden sollen, wird mit 0,5 ml des Kaliumphosphatpuffers [III,2], pH 7,1, aufgelöst, während der Extrakt für die KABI-Antikörper-Proben mit 0,5 ml des Phosphatsalzpuffers [II,3], pH 7,5, in Lösung gebracht wird. Das Probenvolumen im RIA beträgt 200 μ l (siehe Kap. 3.3):

Referenzserum (2fach): 200 μ l Referenzserum [I,4]
100 μ l Tracer [I,2]
100 μ l Arendt-Antikörper [III,3]

Das Ergebnis liegt außerhalb der Standardkurve im positiven Bereich. Da die Standardkurve einen sehr flachen Verlauf zeigt (Abb. 12) und der Prozentbindungswert B/B_0 der Standardkonzentration von 2000 ng/l 43 % beträgt, läßt sich für den gemessenen Bindungswert B/B_0 % des Referenzserums von 22 % keine entsprechende Hormonkonzentration ermitteln.

Zum Vergleich erfolgt die Bestimmung des Referenzserums mit dem KABI-Antikörper:

200 μ l Referenzserum [I,4]
100 μ l Tracer [I,2]
100 μ l KABI-Antikörper [I,3]

Die Konzentration des Referenzserums beträgt: $\bar{x} = 191$ ng/l.

Dieser Wert entspricht einer „kalten“ Recovery von 95 %, wenn $200 \text{ ng/l} \triangleq 100 \%$.

- Intraassay-Varianz

Es werden Poolserumproben mit einem Melatoninstandardzusatz von 100 ng/l in verschiedenen Volumina extrahiert und mit beiden Antikörpern bestimmt. Wie bei der Bearbeitung des Referenzserums wird der Extrakt für die Bestimmung mit dem Arendt-Ak mit dem Kaliumphosphatpuffer [III,2], pH 7,1 und derjenige für den RIA mit dem KABI-Ak mit dem Phosphatsalzpuffer [II,3], pH 7,5 aufgelöst.

1. Gruppe: Das Probenvolumen für die Extraktion beträgt 1,0 ml, das Probenvolumen im RIA beträgt 200 μ l. Es erfolgt somit eine Zweifachbestimmung. Jeweils 3 Proben werden mit dem Arendt- und dem KABI-Antikörper bestimmt.

a) Bestimmung mit dem Arendt-Antikörper:

Mittelwert $\bar{x} = 275$ ng/l

Standardabweichung $s = 55,4$

Variationskoeffizient $V = 20 \%$

Die „kalte“ Recovery beträgt 275 %, wenn $100 \text{ ng/l} \triangleq 100 \%$

- b) Bestimmung mit dem KABI-Antikörper:

Mittelwert $\bar{x} = 67 \text{ ng/l}$

Standardabweichung $s = 4,16$

Variationskoeffizient $V = 6,1 \%$

Die „kalte“ Recovery beträgt 67 %, wenn $100 \text{ ng/l} \triangleq 100 \%$

2. Gruppe: Das Probenvolumen für die Extraktion beträgt 2,0 ml mit einer Standardhormonkonzentration von 100 ng/l. Die Bestimmung im RIA erfolgt wie in Gruppe 1 mit einem Probenvolumen von 200 μl .

- a) Bestimmung mit dem Arendt-Antikörper: Die Hormonkonzentrationen liegen durch den flachen Verlauf der Standardkurve außerhalb (höher) des Prozentbindungsbereiches, der von den Standardwerten angegeben wird (außerhalb im positiven Bereich).

- b) Bestimmung mit dem KABI-Antikörper:

Mittelwert $\bar{x} = 84 \text{ ng/l}$

Standardabweichung $s = 14,7$

Variationskoeffizient $V = 17,5 \%$

Die „kalte“ Recovery beträgt 84 %, wenn $100 \text{ ng/l} \triangleq 100 \%$

- *Hypophysenbelastungstest mit LHRH*

Der LHRH-Test wird mit dem Präparat Relefact LHRH, D.777-0405, Fa. Hoechst bei einem männlichen, 14 Jahre alten Patienten der Endokrinologischen Abteilung der II. Medizinischen Klinik, Universitätsklinik Mainz, durchgeführt, der wegen einer von der Hypothalamus-Hypophysen-Achse unabhängigen Erkrankung in stationärer Behandlung ist.

Zu den folgenden Zeiten werden die Serumproben entnommen:

- 30', 0', 30', 60', 90', 120'.

Während der gesamten Belastungsdauer wird eine Infusion physiologischer Kochsalzlösung zum Offenhalten der punktierten Kubitalvene angelegt. Bei den Blutabnahmen wird darauf geachtet, daß keine mit Infusionslösung vermischten Blutproben verwendet werden.

Zum Zeitpunkt „0“ min. wird nach Entnahme einer Blutprobe 1 ml des LHRH-Präparates mit der Konzentration 0,025 mg/ml intravenös injiziert.

Das Probenvolumen für die Extraktion beträgt 1,0 ml; das Probenvolumen im RIA 200 μl . Jede Serumprobe wird in Zweifachbestimmung jeweils mit dem Arendt- und mit dem KABI-Antikörper behandelt.

Die ermittelten Melatoninkonzentrationen sind in Tabelle VIII. aufgeführt.

Die mit dem KABI-Antikörper gemessenen Antigenkonzentrationen befinden sich in einem Bereich zwischen 13,8 und 5,2 ng/l. Diese Werte liegen unterhalb der Konzen-

tration des niedrigsten Standardwertes = 62,5 ng/l und sind kleiner als die durch die Sensitivität ausgedrückte kleinste, noch zu bestimmende Hormonkonzentration, ca. 38 ng/l.

Die Melatoninkonzentrationen, die durch Verwendung des Arendt-Antikörpers im RIA ermittelt wurden, liegen im Bereich zwischen 450 und 50 ng/l.

5. Haltbarkeitsversuche

Auf ihre Haltbarkeit und einen eventuellen Verlust ihrer spezifischen Eigenschaften hin werden Tracer [I,2], Melatoninstandard [I,1], KABI-Antikörper [I,3] und Referenzserum [I,4] getestet. Diese Reagenzien werden in gelöstem Zustand während eines Zeitraums von 2 Wochen bei Kühlschranktemperatur (+2°C bis +8°C) aufbewahrt. Mit der beschriebenen Methode nach Wetterberg et al. (65, 21) werden diese Proben eines Kits an 2 unterschiedlichen Versuchstagen im Abstand von 2 Wochen bestimmt.

Die Ergebnisse sind der Tabelle XII zu entnehmen. Radioaktiv markiertes Melatonin (Tracer), Melatoninstandard und Antikörper zeigen keinen Unterschied in der Zählrate (cpm) und in der spezifischen Bindung.

Dagegen ist ein deutlicher Konzentrationsabfall des Referenzserums zu beobachten, das 2 Wochen lang aufbewahrt wurde. Der Konzentrationsunterschied beträgt 50 ng/l, ca. 20 % der „kalten“ Recovery, wenn $140 \text{ ng/l} \triangleq 70 \% \text{ „kalte“ Recovery}$.

V. UNTERSUCHUNGEN AN PROBANDEN

1. Versuchsaufbau

Bei 4 Probanden werden das Profil der Melatoninserumkonzentrationen von 20.00 bis 8.00 Uhr sowie die Tages- bzw. Nachtmelatoninurinausscheidung von 8.00 bis 20.00 Uhr bzw. 20.00 bis 8.00 Uhr unter verschiedenen Bedingungen bestimmt.

Der Versuch wird während drei Nächten und Tagen durchgeführt: Während der ersten Nacht erhält der Proband keine Medikamente oder Substanzen, während der zweiten Nacht wird ihm ein Schlafmittel (Phenaemal®) verabreicht und in der dritten Nacht wird ein Hypophysenbelastungstest mit LHRH – Luteinisierendes Hormon Releasing Faktor – durchgeführt.

1) *Melatoninserumprofil während der Nacht ohne pharmakologische Einflüsse*

Während einer Nacht, von 20.00 Uhr bis 8.00 Uhr, werden in 2stündlichem Abstand ca. 10 ml Blut aus einer Kubitalvene entnommen, die mit einer Infusion physiologischer Kochsalzlösung offengehalten wird. Bei der Blutabnahme wird darauf geachtet, daß die Blutprobe nicht mit der Infusionslösung vermischt ist, die ersten 3 bis 5 ml der entnommenen Blutprobe werden daher nicht verwendet.

Das Blut wird zentrifugiert und das Serum bei ca. -20°C eingefroren. Nach der nächtlichen Serie der Blutentnahmen, um 8.00 Uhr, werden ebenfalls 10 ml aus dem während der Nacht – 20.00 bis 8.00 Uhr – gesammelten und vorher geschüttelten Urin entnommen und eingefroren.

2) *Schlafmittelgabe*

Der Proband erhält um 21.00 Uhr eine Tablette Phenaemal® 0,1 g. Die Blut- und Urinproben werden in der oben beschriebenen Art entnommen und eingefroren. Die Gabe des Barbiturats erfolgt zur Erreichung eines kontinuierlichen Schlags während der Blutentnahmen.

3) *LHRH-Hypophysenbelastung*

Die LHRH-Infusion wird mit Ampullen zu je 100 µg LHRH und isotonischer Kochsalzlösung hergestellt und dem Patienten mittels einer Infusionspumpe über eine Kubitalvene infundiert, die anschließend mit einer Infusion mit isotoner Kochsalzlösung offengehalten wird.

Die Blut- und Urinproben werden wie oben beschrieben entnommen und behandelt. Während der drei Nächte eines Versuchs werden das Schlafverhalten und besondere klinische Auffälligkeiten der Probanden beobachtet und registriert (siehe Kap. X, 2.).

2. Beschreibung der verwendeten Pharmaka

Relefact® LHRH 0,1 mg

Eine Ampulle *Relefact®* LHRH 0,1 mg zu 1ml enthält: 0,1 mg Gonadorelin. Es wird das Präparat *Relefact®* LHRH 0,1 mg, D 777 – 0,405 der Fa. Hoechst verwendet.

LHRH ist ein Dekapeptid mit bekannter Aminosäuresequenz und bewirkt in der Adenohypophyse die Freisetzung von LH und FSH.

Die Probanden erhalten jeweils eine Infusion Relefact® LHRH in der Konzentration von 1 µg/kg Körpergewicht/Stunde während einer Infusionsdauer von 6 Stunden.

Phenaemal® 0,1

Eine Tablette Phenaemal 0,1 enthält 0,1 g Phenyl-Aethyl-Barbiturat.

3. Probanden

Für den Versuch haben sich freundlicherweise vier Patienten (3 männliche Probanden im Alter zwischen 45 und 56 J. sowie eine Probandin im Alter von 23 J.) der Endkrynologischen Abteilung der II. Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Mainz zur Verfügung gestellt. Diese Patienten befanden sich aufgrund ihres Insulin-pflichtigen Diabetes mellitus während vier Tage und Nächte zur Diabeteseinstellung an der Beta-Zelle in stationärer Behandlung und hatten neben dem Diabetes mellitus keine weiteren endokrynologischen Erkrankungen.

Die klinischen und laborchemischen Daten, ihre Begleitmedikation und insbesondere das Allgemeinbefinden und Schlafverhalten der Probanden sind im Kapitel X, 2. zusammengestellt.

VI. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Untersuchungen zur Optimierung der radioimmunologischen Bestimmungsmethode

Die vorliegende Arbeit benutzte einen konfektionierten Reagenziensatz (Kit) der Firma KABI (21) zur radioimmunologischen Bestimmung von Melatonin (siehe Kap. III. 3.).

Die nächtlichen Konzentrationsanstiege von Melatonin im Serum mit entsprechenden hohen Morgenwerten der Melatoninurinkonzentration und des Melatonin-Kreatinin-Quotienten konnten anhand der Versuche an Probanden (Kap. IV.) nachgewiesen werden. Die Serummelatoninkonzentrationen am Morgen lagen jedoch in einem nicht meßbar niedrigen Bereich.

Mit der beschriebenen Bestimmungsmethode nach Wetterberg (65, 21) (siehe Kap. III. 3.) wurde eine Sensitivität von 38 ng/l als kleinste noch zu bestimmende Hormonkonzentration nachgewiesen, siehe Tab. V. Dabei war es nicht möglich, die tagsüber im Serum auftretenden Melatoninkonzentrationen zu erfassen.

In der Tab. XI sind die Qualitätskontrollen der radioimmunologischen Bestimmung der Arbeit nach der Methode von Wetterberg im Vergleich mit den Ergebnissen der Literatur (65, 21) aufgeführt.

Die vorliegende Arbeit befaßte sich daher zunächst mit Modifikationen der radioimmunologischen Bestimmungsmethode zur Verbesserung der Sensitivität.

Bei der Modifikation der Extraktion nach der Arbeitsmethode von Arendt (5) ergab sich eine mit 70 bzw. 88 % weitaus höhere „heiße“ bzw. „kalte“ Recovery als bei dem Extraktionsverfahren nach Wetterberg (65, 21). Eine Verbesserung der Sensitivität konnte durch diese Abwandlung der Bestimmungsmethode jedoch nicht erzielt werden, da die günstigeren Ergebnisse der Wiederfindung auf eine Mitreaktion von Vorstufen und Metaboliten des Melatonins – z. B. 5-Methoxytryptamin – bei Einsetzen eines zu alkalischen Puffers von über pH 7,5 beruhen sollen (65).

Lediglich die Prüfung der Inkubationstemperatur von 4°C, 20°C und 37°C ergab insofern eine Verbesserung der Bestimmungsmethode, als bei 4°C eine über 8 Stunden stabile spezifische Bindung B_0 von $\leq 50\%$ erreicht wurde. Die radioimmunologische Bestimmung nach Wetterberg (65, 21) wurde bezüglich der Inkubationstemperatur von 4°C geändert.

Die Prüfung verschiedener Verfahren zur Trennung der Ag-Ak-Komplexe von nicht-gebundenem Antigen – nämlich Nachwaschen mit Ammoniumsulfat, die Verwendung eines Doppelantikörpers und die Trennung mit Aktivkohle – im Vergleich zu dem Trennungsvorgang mit einmaligem Aussalzen mit Ammoniumsulfat gemäß der Methode nach Wetterberg (65, 21) ergab keine Optimierung der Sensitivität.

Schließlich zeigte die Verwendung eines weiteren Melatoninantikörpers – Arendt-Antikörper (4) – in der Gebrauchsverdünnung 1:6000 eine mit ca. 30 % niedrigere spezifische Bindung B_0 als der Antikörper des KABI-Kits K 244 (21). Die spezifische

Bindung B_0 , die mit dem Arendt-Ak in einer Gebrauchsverdünnung von 1:600 – bzw. in einer Endverdünnung von 1:2400 – und mit Zusatz von Rinder- γ -Globulin in Höhe von 3 mg/ml bzw. 4 mg/ml erstellt wurde, liegt mit $\bar{x} = 69,2\%$ bzw. $71,6\%$ der Gesamtaktivität in einem deutlich zu hohen Bereich.

Die mit dem Arendt-Antikörper bestimmte Standardkurve verläuft deutlich flacher als diejenige, die mit dem KABI-Antikörper erstellt wurde (siehe Kap. III. 4.3.3).

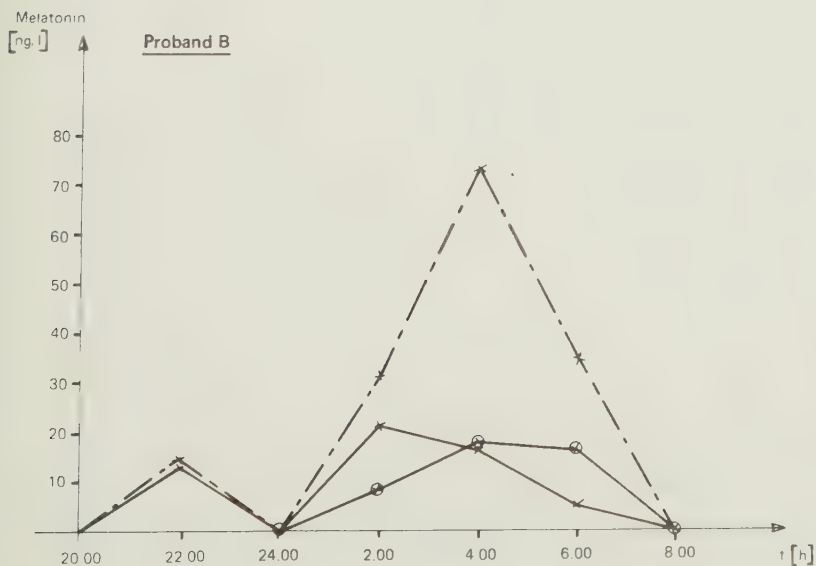
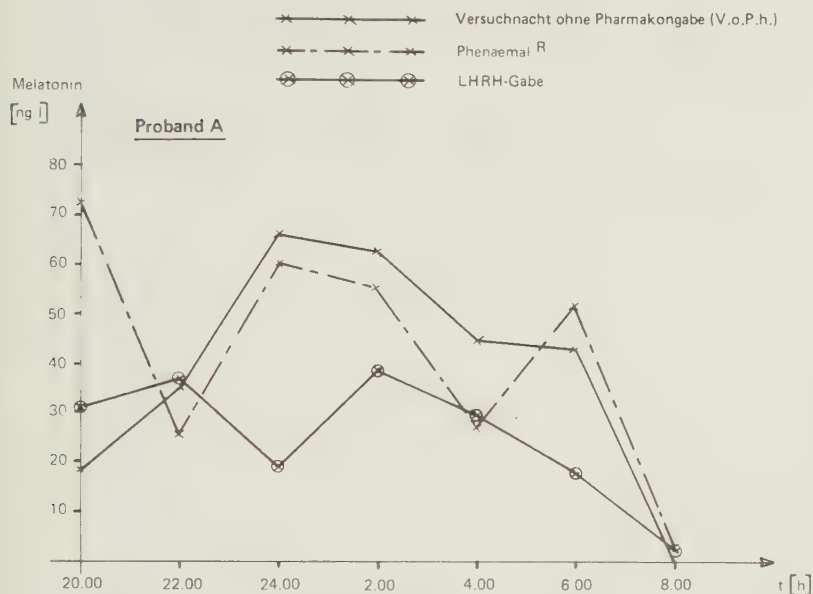
2. Klinische Ergebnisse

Der Tabelle XIII sind die Serummelatoninkonzentrationen während der drei Versuchsnächte zu entnehmen. Bei drei Probanden – A., B., D. – ist der nächtliche Serumkonzentrationsanstieg des Melatonins nachweisbar.

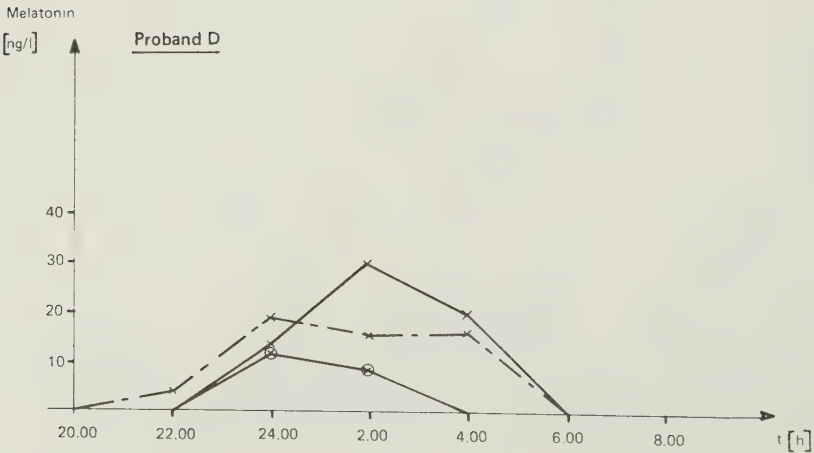
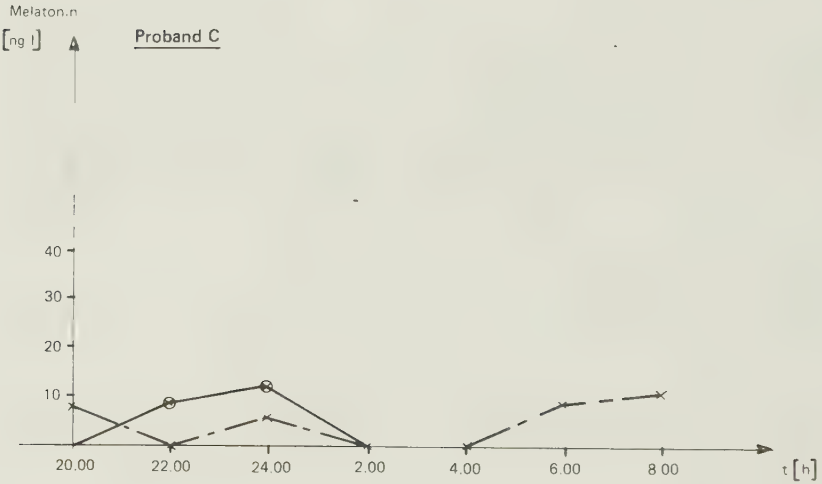
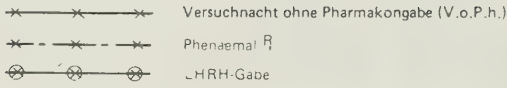
Gleichzeitig ergibt sich nach LHRH-Gabe ein nächtlicher Serumkonzentrationsgipfel von LH um 22.00 bis 4.00 Uhr bei allen vier Probanden.

Diese Werte sind in der Abbildung 13 grafisch dargestellt.

Abbildung 13: Melatonin-Serumkonzentration bei vier Probanden während drei Versuchsnächte unter LHRH-Gabe und Schlafmittelgabe (siehe Tab. XIII)



Fortsetzung Abb. 13

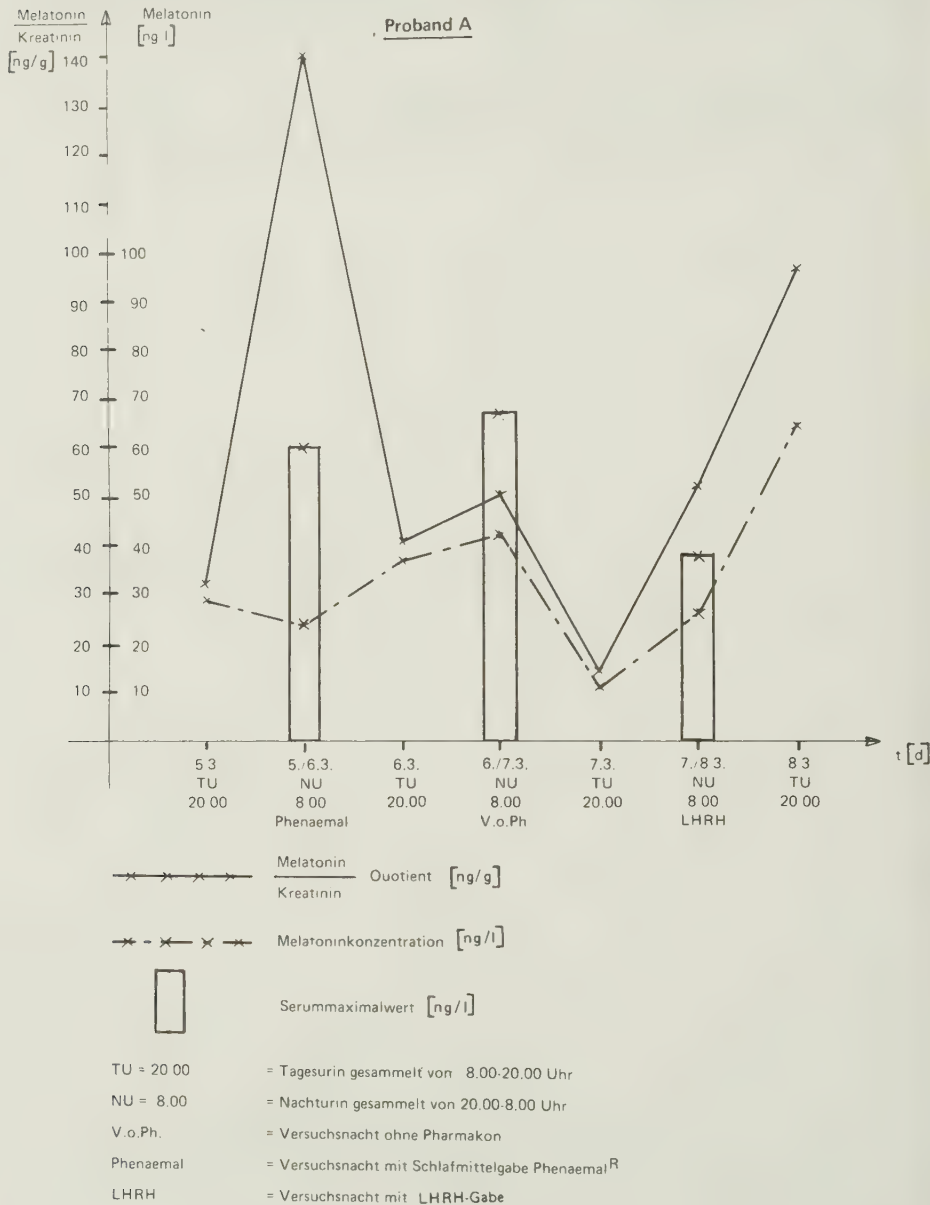


In der Tabelle XIV werden die Werte der Melatoninausscheidung im Urin dargestellt. Um eine genauere Angabe über die tatsächlich im 12-Stunden-Urin ausgeschiedene Melatoninmenge zu erhalten, wurden neben der Melatoninkonzentration [ng/12 h] die Kreatinin-Konzentration [g/12 h] (siehe Tab. XIV) berücksichtigt und der Melatonin-Kreatinin-Quotient [ng/g] gebildet.

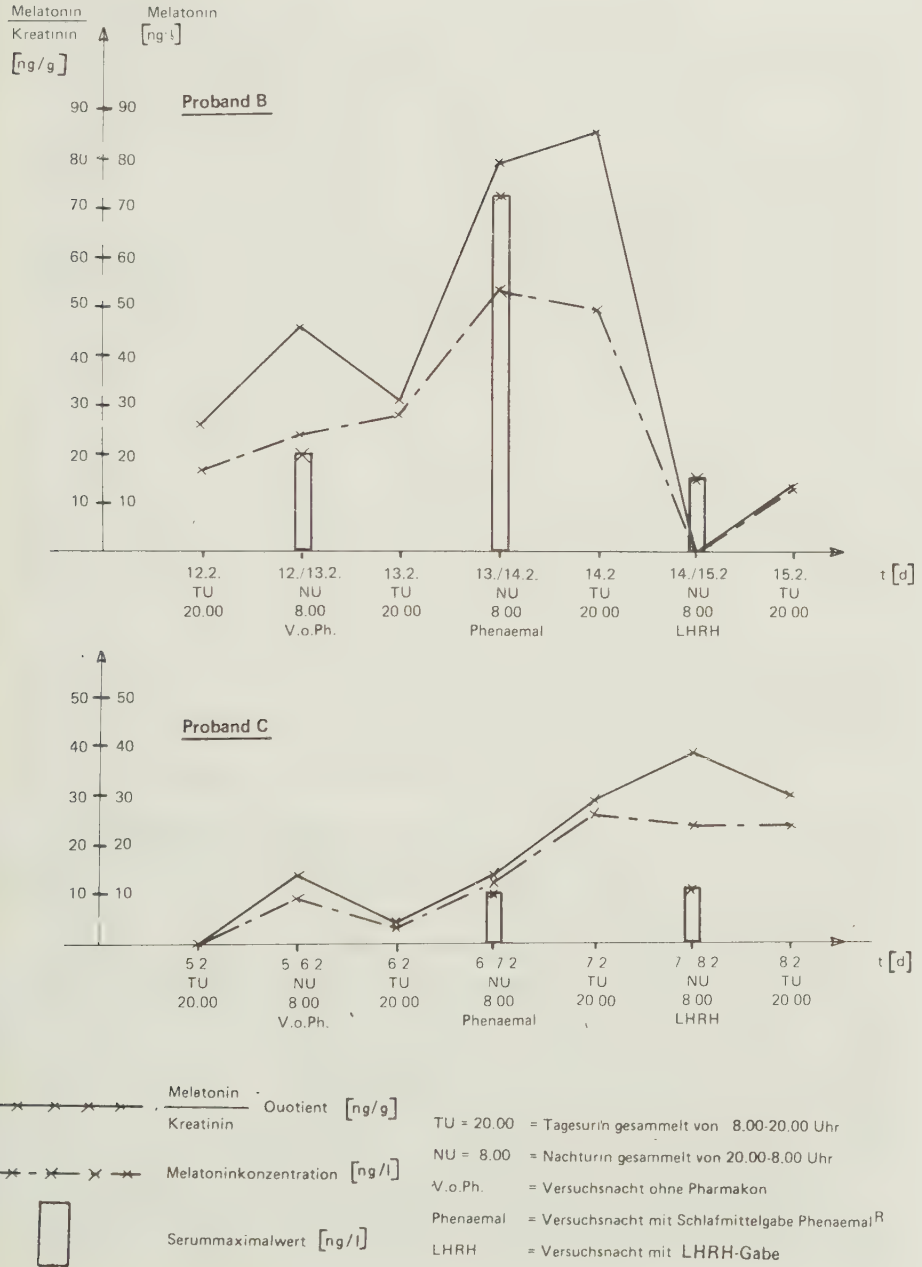
Die Serummaximalwerte der jeweiligen Versuchsnacht werden zum Vergleich mit der Urinmelatoninausscheidung ebenfalls aufgeführt.

Die Werte der Tabelle XIV werden in der Abb. 14 grafisch dargestellt.

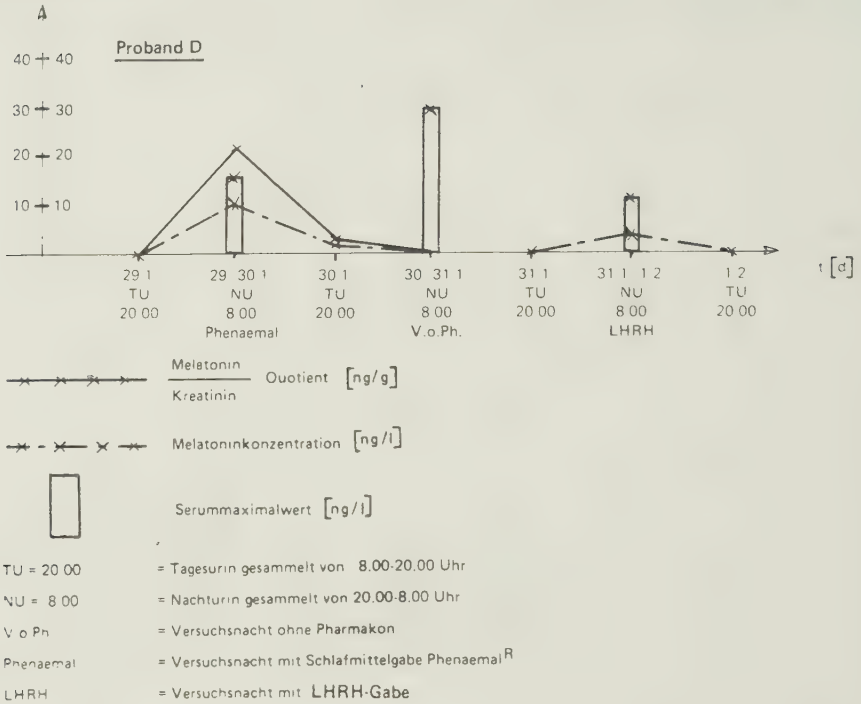
Abbildung 14: Melatoninkonzentration im Urin [ng/l] und Urin-Melatonin-Kreatininquotient [ng/l] bei vier Probanden während drei Versuchsnächten unter LHRH-Gabe und Schlafmittelgabe (siehe Tab. XIV) im Vergleich zu den Melatoninserummaximalwerten der entsprechenden Versuchsnacht.



Fortsetzung Abb. 14



Fortsetzung Abb. 14



2.1 Melatoninkonzentrationsprofil ohne pharmakologische Einflüsse

Bei den drei Probanden A., B., D. zeigt sich in der Versuchsnacht ohne Pharmakon ein deutlicher Serumkonzentrationsgipfel zwischen 24.00-4.00 Uhr gegenüber den um 20.00 Uhr ermittelten Ausgangswerten, die zwischen 6.00 und 8.00 Uhr wieder erreicht werden. Bei einem Probanden - C. - liegen sämtliche Werte unterhalb der kleinsten zu bestimmenden Konzentration.

Mit Ausnahme eines Wertes - Proband A, Urin während der Nacht unter Barbituratgabe - verhalten sich die Werte für die Melatoninkonzentration im 12-Stunden-Urin [ng/12 h] und den Melatonin-Kreatinin-Quotienten gleichsinnig; die Kurven ihrer grafischen Darstellungen verlaufen annähernd parallel.

Die korrespondierenden 8.00 Uhr-Urinwerte des Melatonin-Kreatinin-Quotienten entsprechen weitgehend den beschriebenen nächtlichen Serumgipfelwerten. Eine Tag-Nacht-Spontanrhythmik ist deutlich erkennbar.

Auch bei dem Probanden C. zeigt sich eine circadiane Rhythmik in den 12stündlich entnommenen Urinproben bei unterhalb des Meßbereichs liegenden Serumkonzentrationen auch in der Nacht (s.o.).

2.2 *Schlafmittelgabe*

Mit Ausnahme des Probanden C. zeigen die Serummelatoninkonzentrationen in der Nacht nach Gabe eines Barbiturats (Phenaemal[®] 0,1) ebenfalls Gipfelwerte zwischen 24.00 und 4.00 Uhr. Bei dem Probanden C. ließ sich kein eindeutiger Kurvenverlauf mit einem Serumkonzentrationsgipfel ermitteln.

Bei den Probanden A., B., D. fielen die Werte des Melatonin-Kreatinin-Quotienten um 8.00 Uhr im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsnächten am höchsten aus. Dabei zeigt sich ein gleichsinniges Verhalten von Melatoninurinkonzentration und Melatonin-Kreatinin-Quotienten bei den beiden Probanden B. und D. (53,5 ng/12 h und 80 Melatonin-Kreatinin-Quotient bzw. 10,5 ng/12 h und 22).

Bei dem Probanden A. differieren diese beiden Parameter sehr stark (Melatoninurinkonzentration 23 ng/12 h und Melatonin-Kreatinin-Quotient 140 bei einer zu berücksichtigenden Urinmenge von 250 ml/12 h).

2.3 *LHRH-Hypophysenbelastungstest*

Die Serumkonzentrationskurven der drei Probanden A., B., D. zeigen in der Nacht der LHRH-Gabe mit Werten zwischen 13 und 38 ng/l den flachsten Verlauf gegenüber denjenigen der beiden anderen Versuchsnächte. Entsprechend der Serumkonzentration wurden für die Melatoninurinkonzentrationen und Melatonin-Kreatinin-Quotienten niedrige Werte ermittelt.

Bei dem Probanden C. läßt sich lediglich in der Nacht der LHRH-Belastung ein Serumkonzentrationsgipfel um 24.00 Uhr mit 12 ng/l nachweisen, und die Werte der Melatoninurinkonzentration und des Melatonin-Kreatinin-Quotienten fallen bei diesem Probanden um 8.00 Uhr nach der Nacht der LHRH-Belastung am höchsten aus.

VII. DISKUSSION

Die Arbeit stellt eine Pilotstudie an drei männlichen und einer weiblichen Probandin mit dem Ziel dar, die spontane circadiane Rhythmik der Melatoninserumkonzentration mit ihren entsprechenden Urinwerten nachzuweisen und den Einfluß eines Barbiturats und von LHRH auf das nächtliche Serumkonzentrationsverhalten des Melatonins zu prüfen.

Die aus der Literatur bekannte, circadiane Spontanrhythmik der Melatoninsekretion konnte in unseren Untersuchungen bei drei Probanden – mit Ausnahme der Werte für den Probanden C. – bestätigt werden. Auch in den Nächten nach Gabe eines Barbiturats ergab sich ein Gipfel der Melatoninserumkonzentration. Deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Werten der Versuchsnacht ohne pharmakologische Einflüsse wurden nicht gefunden.

R.J. Wurtman und D.P. Cardinali haben 1974 einen direkten hemmenden Einfluß der Epiphyse auf die Hormone der hypothalamo-hypophyso-gonadalen Achse auf den Ebenen des Hirnstamms, der Hypophyse und der Gonaden anhand von Tierexperimenten nachgewiesen (75, 10).

Untersuchungen am menschlichen Organismus konnten zum großen Teil die entgegengesetzte Beeinflussung von Melatonin einerseits und LH und FSH andererseits bestätigen (s. Kap. I.5.4). Sie wiesen abnehmende nächtliche Melatoninkonzentrationen bei zunehmendem LH- (28) bzw. Testosteronspiegel (68) während fortschreitender Pubertät nach.

Daraus resultiert die Vorstellung, daß mit einem LH- und FSH-Anstieg durch LHRH-Stimulation eine Abnahme der nächtlichen Melatoninkonzentration im Serum einhergeht. Unter Verwendung des nächtlichen Serumkonzentrationsanstiegs von Melatonin sollte dieser Effekt einer LHRH-Belastung geprüft werden. Bei drei Probanden – A., B., D. – war auch eine niedrige nächtliche Melatoninsekretion unter LHRH-Infusion zu beobachten. Dabei entsprechen den flachen Serumkonzentrationskurven des Melatonins niedrige Morgenurinwerte um 8.00 Uhr. Bei einem Probanden – C. – war kein hemmender Einfluß von LHRH bei vorhandenem Anstieg von LH im Serum nachweisbar. Dieser Proband hatte in den Versuchsnächten sehr schlecht geschlafen. Das gestörte Schlafverhalten dieses Probanden könnte eventuell eine Erklärung für den fehlenden Kurvenverlauf der Melatoninkonzentrationen im Serum darstellen.

Ob die nachgewiesenen niedrigen Melatoninserumkonzentrationen nach einer LHRH-Belastung bei den drei Probanden tatsächlich auf den Effekt des Releasinghormons zurückzuführen sind, kann aufgrund der geringen Probandenzahl statistisch nicht gesichert werden. Zur Klärung dieser Annahme sind Untersuchungen mit größeren Probandenzahlen notwendig. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen jedoch einen eher inhibitorischen Effekt von LHRH oder Gonadotropinen auf die Epiphyse wahrscheinlich.

Aufgrund der einfachen Gewinnung des Untersuchungsmaterials konzentrieren sich viele Untersuchungen auf die Bestimmung der Melatoninausscheidung im Urin. Jedoch zeigen sich in der Literatur unterschiedliche Auffassungen über die Zusammenhänge zwischen Serumkonzentration und Ausscheidung von Melatonin im Urin: Wetterberg wies eine enge Korrelation zwischen dem nächtlichen Serumgipfelwert gegen 2.00 Uhr und der Morgenurinkonzentration um 8.00 Uhr nach (62).

Dagegen zeigten Wurtman et al. (78) sowie Åkerstedt et al. (1), daß bei Schlafentzug über 64 Stunden die Urinmelatoninkonzentrationen nicht abnahmen, obwohl im Serum während des Schlafentzugs niedrige Melatoninkonzentrationen ermittelt wurden.

Bei der Interpretation der Melatoninausscheidung im Urin sind verschiedene Überlegungen zu berücksichtigen:

Nach Tharandt und Reinwein (56) beträgt die Ausscheidung von unverändertem Melatoninhormon 1 %. Über 80 % des Melatonins werden durch Hydroxylierung in der Leber mit anschließender Sulfatkonjugation und in geringerem Umfang durch Glucuronierung metabolisiert. Diese Metaboliten werden ebenfalls renal ausgeschieden.

Trotz dieser einschränkenden Betrachtungen konnte in der Arbeit ein Zusammenhang – mit Ausnahme von 2 Tages- und 4 Nachtwerten – zwischen den Serumkonzentrationen von Melatonin und der Melatoninurinausscheidung gezeigt werden.

In der Literatur sind die Melatoninausscheidungen im Urin in der Konzentration [ng/l] angegeben (62), wobei die Urinmenge während des Untersuchungszeitraums unberücksichtigt bleibt. Zur Bestimmung der tatsächlich ausgeschiedenen Urinmenge und als Parameter für die Zuverlässigkeit der Urinsammlung während des jeweiligen Untersuchungszeitraumes wurde der Melatonin-Kreatinin-Quotient gebildet.

Die Tag- und Nachtwerte des Melatonin-Kreatinin-Quotienten zeigen dabei größere Schwankungen, ca. im Verhältnis 2:1 betragend, im Vergleich zu der Melatoninkonzentration im Urin.

Neben der Aussage über die Zuverlässigkeit der Urinsammlung hat der Melatonin-Kreatinin-Quotient den Vorteil, daß er die Nierenfunktion berücksichtigt. Aus diesem Grund wirken sich circadiane Schwankungen der Melatoninsekretion deutlicher aus als bei der alleinigen Angabe der Melatoninurinkonzentration.

Eine hundertprozentige Verbesserung der Bestimmung der Melatoninausscheidung im Urin konnte jedoch durch den Melatonin-Kreatinin-Quotienten im Vergleich zur Melatonin-Konzentration im Urin [ng/12 h] nicht erreicht werden.

Folgende Nachteile sind zu berücksichtigen:

Zur Berechnung des Melatonin-Kreatinin-Quotienten geht die Bestimmung von zwei Parametern mit ihren Streuungen ein, aus der sich eine Addition der Streufehler ergibt. Außerdem steht mehreren Serumkonzentrationen während einer Verlaufsbeobachtung nur ein einziger Urinwert gegenüber.

Aus diesen Gründen erscheint die Bestimmung des Melatonins im Urin zunächst unzuverlässiger als die Serumbestimmungen. Weitere Untersuchungen sind daher

notwendig, um die Urinmelatoninausscheidung im Hinblick auf die praktikable Gewinnung des Untersuchungsmaterials als Parameter der Epiphysenfunktion zu etablieren.

Zur Beurteilung der Epiphysenfunktion sind außerdem der Metabolismus des Melatonins in der Leber, der durch Leberfunktionsstörungen beeinträchtigt und durch Pharmaka gehemmt oder induziert werden kann, sowie die Konjugation des hydroxylierten Abbauproduktes – 6-Hydroxymelatonin – mit Glucuron- oder Schwefelsäure zu berücksichtigen.

Den Versuchen an Probanden wurden die Bearbeitung und die Modifikationen der radioimmunologischen Bestimmungsmethode nach Wetterberg et al. (65, 21) zur Optimierung der Sensitivität vorangestellt.

Die radioimmunologische Bestimmungsmethode wurde hinsichtlich der Parameter der Qualitätskontrolle, der Inkubationstemperatur und -zeit, des Vergleichs zur Bestimmungsmethode nach Arendt et al. (5), der Trennungsv erfahren und der Haltbarkeit der Substanzen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde das Extraktionsverfahren nach Wetterberg (65, 21) mit der Methode nach Arendt (5) insofern kombiniert, als der pH-Wert des Phosphatsalzpuffers von 7,5 auf 10 erhöht wurde. Daraus resultierten günstigere Werte für die „heiße“ Recovery und die Intraassay-Varianz: Die nach der Arendt-Methode bestimmte „heiße“ Recovery beträgt $\bar{x} = 93\%$ der Gesamtaktivität. Dagegen ergab sich nach der radioimmunologischen Bestimmungsmethode nach Wetterberg eine „heiße“ Recovery von $\bar{x} = 51,4\%$ der Gesamtaktivität. Die teils nach der Arendt- und teils nach der Wetterberg-Methode ermittelte „heiße“ Recovery beträgt $\bar{x} = 69,2\%$ der Gesamtaktivität (siehe Tab. IX).

Für die teils nach Arendt und teils nach Wetterberg bestimmte Intraassay-Varianz ergaben sich für Poolserum mit Standardhormonzusatz von 125 ng/l ein Wert von $V=20,5\%$ und für Poolserum mit 250 ng/l Melatoninstandard $V=33\%$. Im Vergleich dazu wurde durch Extraktion nach der Wetterberg-Methode eine Intraassay-Varianz von $V=38\%$ für Proben mit Standardhormonzusatz 125 ng/l ermittelt (siehe Tab. II).

Das in der wäßrigen, abzusaugenden Phase nach der Extraktion der Arendt- und Wetterberg-kombinierten Methode verbleibende radioaktiv markierte Melatonin beträgt 37% der Gesamtaktivität (siehe Kap. IV. 4.2.2 „Überstandskontrolle“).

Hinsichtlich der „heißen“ Recovery von 69,2% der Gesamtaktivität zeigt sich damit, daß durch den Extraktionsvorgang tatsächlich ca. 30% des Hormons verlorengehen. Dieses muß bei Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die günstigeren Werte für die „heiße“ Recovery nach der Arendt- und der teils nach Wetterberg, teils nach Arendt durchgeführten Methode lassen jedoch nicht den Schluß zu, daß eine größere Extraktionsausbeute an Melatonin stattfindet. Vielmehr ist ein günstigerer Verteilungskoeffizient für Melatonin bei verändertem pH-Wert vorstellbar. Andererseits wird die höhere Wiederfindung in der Literatur (65) als eine Mitreaktion von verwandten Indolaminen – wie z.B. 5-Methoxytryptamin – bei Verwenden eines alkalischeren Puffers als pH 7,5 erklärt (65).

Obwohl daher die Ergebnisse der Qualitätskontrolle für die Methode teils nach Wetterberg, teils nach Arendt günstiger ausfallen als diejenigen der Methode nach Wetterberg, wird aus den obengenannten Gründen die Methode nach Wetterberg (65, 21) mit dem Extraktionspuffer von pH 7,5 beibehalten.

Die radioimmunologische Bestimmung nach der Methode nach Wetterberg wurde lediglich hinsichtlich der Inkubationstemperatur modifiziert. Die weiteren Abwandlungen der Methode nach Wetterberg ergaben keine Optimierung der Sensitivität. Die grafische Darstellung des Versuches der Inkubationszeit und -temperatur (Abb. 8 und 9) zeigt, daß das Gleichgewicht der Reaktion zwischen markiertem bzw. unmarkiertem Antigen und Antikörper bei allen Inkubationstemperaturen – 4°C, 20°C und 37°C – weitgehend gleichschnell eingestellt ist. Die Kurve der Inkubation bei 4°C verläuft gleichmäßiger als diejenigen bei den Inkubationstemperaturen von 20°C und 37°C. Bei 4°C wird schneller und ausgeprägter – auch in dem Versuch der Inkubation bei 4°C und 37°C über nur zwei Stunden – eine optimale spezifische Bindung von $B_0 = 42\text{--}50\%$ der Gesamtkaktivität (17) bereits nach ca. 10 Minuten erreicht.

Zur Optimierung des RIA's wurde die Methode nach Wetterberg (65, 21) insofern abgeändert, als die Inkubation während 60 Minuten nicht bei 37°C sondern bei 4°C erfolgt.

Die Untersuchungen des Trennungsverfahrens zwischen Antikörper-gebundenem und nicht gebundenem Antigen haben keine Verbesserungen gegenüber der einmaligen Ammoniumsulfat-Trennung erbracht.

Die Standardkurve der Doppelantikörper-Trennung (siehe Abb. 10) zeigt einen flacheren Verlauf als die Standardkurve, die nach der Methode nach Wetterberg erstellt worden ist.

Die Standardkurve der Aktivkohle-Trennung (siehe Abb. 10) verläuft unregelmäßig in der Art, daß ihre Werte keine kontinuierlich absteigende Reihenfolge aufweisen. Ihre spezifische Bindung B_0 fällt mit 3,4 % der Gesamtkaktivität sehr gering aus und läßt daher keinen Schluß über ein charakteristisches Bindungsverhalten zwischen Antigen und Antikörper und damit über die Melatoninkonzentration zu. Es liegt nahe, daß die Aktivkohle als Adsorbens zu Interferenzen und damit zu einer Instabilität des Antigen-Antikörper-Komplexes führt.

Die abgeänderte Behandlung des Überstandes nach der Trennung mit Ammoniumsulfat hat keine Verbesserung des RIA's erbracht. Das Nachwaschen des Präzipitates mit Ammoniumsulfat hat dazu geführt, daß einzelne Partikel aus dem Präzipitat gelöst und nach dem zweiten Absaugen bzw. Dekantieren entfernt wurden. Die größten Unregelmäßigkeiten ergaben sich beim Entfernen des Überstandes mit der Wasserstrahlpumpe, was auf eine mechanische Alteration des Präzipitates schließen läßt.

Im Vergleich zum Verfahren nach Wetterberg (65, 21) – einmaliges Trennen mit Ammoniumsulfat – bringt Nachwaschen mit 100 % bzw. 50 %ig gesättigtem Ammoniumsulfat keine besseren Resultate mit sich.

Im Vergleich zwischen dem Arendt- (4) und dem KABI-Antikörper (21) überwiegen die Vorteile des KABI-Antikörpers. Der Arendt-Antikörper hat die günstigste spezifische Bindung B_0 bei einer Rinder- γ -Globulin-Konzentration von 4 mg/ml erreicht. Bei allen weiteren Untersuchungen des Arendt-Antikörpers wurde daher Rinder- γ -Globulin in dieser Konzentration zugefügt.

Dennoch lagen die Werte der spezifischen Bindung B_0 ca. 10-15 % unterhalb derjenigen des KABI-Antikörpers.

Die Arendt-Antikörper-Gebrauchsverdünnung von 1:600 erbrachte Werte für die spezifische Bindung B_0 von 68,5-71,9 % der Gesamtaktivität. Da die für den RIA optimale spezifische Bindung B_0 ca. 50 % (17) betragen sollte, liegen die Werte für diese Gebrauchsverdünnung zu hoch. Es bleibt zu untersuchen, ob sich die optimale spezifische Bindung des Arendt-Antikörpers bei einer Gebrauchsverdünnung zwischen 1:600 und 1:6000 befindet und dabei noch ausreichende Zählraten erreicht werden. Die mit dem Arendt-Antikörper erstellte Standardkurve hat einen im Vergleich zum KABI-Antikörper sehr flachen Verlauf (Abb. 12). Die Probenkonzentrationen, die mit dem Arendt-Antikörper ermittelt worden sind, haben einen höheren Prozentbindungswert als diejenigen der Standardprobe 2000 ng/l. Somit fallen alle Werte zu hoch außerhalb des Meßbereiches aus.

Es ist zu vermuten, daß diese zu hohen Meßwerte durch eine eventuelle Unspezifität des Antikörpers, d.h. seine Kreuzreaktionen mit Melatoninanalogen, oder durch den alkalischen Extraktionspuffer von pH 10 hervorgerufen werden.

Die Ergebnisse des Hypophysenbelastungstests (siehe Tab. VIII) zeigen ebenfalls im Vergleich zu den mit dem KABI-Antikörper erstellten Werten zu hohe Melatoninkonzentrationen an. Es ist zu beachten, daß der Hypophysenbelastungstest während des Tages durchgeführt wurde und mit dem KABI-Antikörper ermittelte niedrige Konzentrationen an Melatonin ergaben. Der Belastungstest sollte daher während der Nacht wiederholt werden. Sicher hätte dann der Vergleich zwischen beiden Antikörpern eine größere Aussagekraft.

Bei einer Aufbewahrungszeit von ca. zwei Wochen in gelöstem Zustand bei Kühlschranktemperatur (+2°C bis +8°C) zeigen Tracer, Melatoninstandard und Antikörper keine nennenswerte Änderung ihrer spezifischen Eigenschaften – Radioaktivität, spezifische Bindung – an.

Dagegen nimmt die Hormonkonzentration des Referenzserums innerhalb dieses Zeitraumes von 140 ng/l auf 89 ng/l – um 37 % – ab (siehe Tab. XII).

Gemäß der Literatur (65) und der obengenannten Ergebnisse werden daher alle Proben bis zum Zeitpunkt der radioimmunologischen Bestimmung bei -20°C eingefroren aufbewahrt.

Jedoch haben neuere Untersuchungen auch beträchtliche Melatoninverluste in eingefrorenen Urinproben ergeben, denen eine Unstabilität des Melatonins über einen längeren Zeitraum zugrunde liegen soll (3).

Weitere Haltbarkeitsuntersuchungen der eingefrorenen Proben über einen bestimmten Zeitraum sind daher erforderlich.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von LHRH auf den circadianen Rhythmus der Melatoninsekretion anhand von Serumkonzentrationskurven und Urinkonzentrationen von Melatonin untersucht werden. Zusätzlich sollte die Tag-Nacht-Spontanrhythmik der Melatoninsekretion nachgewiesen sowie der Einfluß eines Barbiturats auf die Epiphyse gezeigt werden.

Von vier Versuchspersonen zeigten drei Probanden (zwei männliche im Alter von 45 bzw. 50 Jahren und eine weibliche Probandin im Alter von 23 Jahren), die alle während der Nacht geschlafen haben, einen spontanen Tag-Nacht-Rhythmus der Serummelatoninkonzentrationen mit Gipfelwerten bis zu 73 ng/l um 24.00-4.00 Uhr bei Ausgangswerten bis zu 13 ng/l um 20.00 Uhr.

Ein vierter, 56 Jahre alter Proband hatte in den Versuchsnächten nicht geschlafen; eindeutige Kurvenverläufe mit Serumgipfelwerten wurden nicht erreicht. Das gestörte Schlafverhalten könnte als Erklärung für die sehr niedrige und unkontinuierlich verlaufenden Serumwerte herangezogen werden.

Die Gabe eines Barbiturats führte bei den drei erstgenannten Probanden zu keiner eindeutigen Beeinflussung der Epiphysenfunktion.

Die während und nach einer nächtlichen LHRH-Infusion ermittelten Serummelatoninkonzentrationen und ihre entsprechenden Werte für die Morgenurinkonzentration an Melatonin sowie den Melatonin-Kreatinin-Quotienten im Urin fielen bei den obengenannten drei Probanden deutlich niedriger als diejenigen der beiden anderen Versuchsnächte aus.

Wegen der geringen Anzahl der Probanden kann in der Arbeit kein Nachweis eines inhibitorischen Einflusses von LHRH auf die Epiphyse geführt werden; eine Erhöhung der Serummelatoninkonzentration unter LHRH-Infusion ist jedoch nicht erfolgt. Die Ergebnisse stehen somit nicht im Widerspruch der Untersuchungen anderer Autoren, sondern befinden sich eher in Einklang mit der in Tierexperimenten (75, 10) und durch Untersuchungen am menschlichen Organismus (68, 28) gefundenen gegenseitigen Beeinflussung von LH und FSH einerseits und Melatonin andererseits.

Die Werte für Melatonin im Urin weisen ebenso eine circadiane Rhythmik mit hohen Melatoninwerten im Morgenurin und niedrigen Werten im Abendurin auf. Da die unterschiedlichen Konzentrationen von Melatonin im Urin durch die schwankende Flüssigkeitsbilanz während 24 Stunden mitbedingt sein kann, wurde der Melatonin-Kreatinin-Quotient zur Bestimmung der eigentlichen epiphysären circadianen Rhythmik herangezogen. Diese ließ sich bei den aufgeführten drei Probanden auch nachweisen. Der Melatonin-Kreatinin-Quotient läßt eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Urinsammlung zu. Jedoch wirkt sich bei der Bestimmung dieses Quotienten nachteilig aus, daß zwei Meßgrößen mit ihren Streufehlern eingehen.

Dem Vorteil eines integrierten Wertes der Melatoninurinbestimmung steht der Nachteil gegenüber, daß im Gegensatz zu Serumbestimmungen einmalige Fehlmessungen nicht deutlich erkennbar werden.

Weitere Verfahren für eine verlässliche Aussage über die Epiphysenfunktion während eines definierten Untersuchungszeitraumes müssen daher noch erarbeitet werden.

Zum anderen wurde die radioimmunologische Bestimmungsmethode geprüft und zum Zweck der Optimierung der Sensitivität modifiziert.

Lediglich führte die Änderung der Inkubationstemperatur gegenüber der Bestimmungsmethode nach Wetterberg et al. (65, 21) zu einer Verbesserung der Sensitivität. Die Verwendung eines anderen Antikörpers, die Anwendung von verschiedenen Trennungsv erfahren und weitere Variationen der Extraktion und der eigentlichen radioimmunologischen Bestimmung ergaben keine Optimierung der Sensitivität. Die Ergebnisse der Abwandlung der Extraktion mit einem alkalischen Puffer über pH 7,5 gemäß der Methode nach Arendt (5) lassen auf die Mitreaktion von verwandten Indolaminen (65) oder einen günstigeren Verteilungskoeffizienten schließen.

Obwohl Melatonin in Serum und Urin beim Menschen in nur sehr niedrigen Konzentrationen – zwischen 0,2 nmol/l während des Tages und 0,8 nmol/l während der Nacht (62) – vorhanden ist, konnte mit dem Radioimmunoassay ein empfindliches und spezifisches Nachweisverfahren gewonnen werden. Die praktische Durchführung der RIA's erfordert jedoch noch weitere Ausarbeitungen zur Vermeidung von Streuungen.

In der Erforschung der Melatoninsekretion beim Menschen stellt sicher die Untersuchung des Einflusses von LHRH auf die Epiphysenfunktion nur einen Teilaspekt dar. Im Brennpunkt des Interesses stehen außerdem die Wirkungen des Thyreotropin Releasing Hormons (TRH) (62), von L-Dopa (62, 52), β -Rezeptoren-Agonisten und -Antagonisten (62, 63), Prolactin und Cortisol (62) und des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) (63).

Die Melatoninbestimmung beim Menschen erlangt mehr und mehr klinische Bedeutung.

So könnten möglicherweise in Zukunft die Melatoninmessung und Aufzeichnung der circadianen Melatoninrhythmik bzw. der Nachweis der gegenseitigen Beeinflussung von LH und FSH einerseits und Melatonin andererseits einen wichtigen Baustein in der Diagnostik der Epiphysen- und Hypophysentumoren bzw. der endokrinen Erkrankungen der hypothalamo-hypophyso-gonadalen Achse darstellen.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Åkerstedt, T., Fröberg, J.E., Friberg, Y., Wetterberg, L. (1979):
Melatonin Excretion, Body Temperature and Subjective Arousal During
64 Hours of Sleep Deprivation.
Psychoendocrinology, 4, 219-225
2. Anton-Tay, F., Diaz, J.L., Fernandez-Guarchiola, A. (1971):
On the Effects of Melatonin upon Human Brains, its Possible Therapeutic
Implications.
Life Sci., Part I, 101, 841-850
3. Arendt, J. (1980):
Current Status of Assay Methods of Melatonin.
Proceedings of the International Symposium on Melatonin, Bremen,
September 28.-30. 1980, Pergamon Press Oxford, pp. 43-44
4. Arendt, J.:
Persönliche Mitteilung von Frau Arendt zum Melatonin-Schaf-Antikörper.
University of Surrey, Department of Biochemistry, Guildford, Surrey
5. Arendt, J., Paunier, L., Sizonenko, P.C. (1975):
Melatonin Radioimmunoassay.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 40, 347
6. Arendt, J., Wetterberg, L., Heyden, T., Sizonenko, P.C., Paunier, L. (1977):
Radioimmunoassay of Melatonin: Human Serum and Cerebrospinalfluid
Hormone Research 8, 65-75
7. Axelrod, J., Weisbach, H. (1961):
Purification and Properties of Hydroxy-Indole-O-Methyltransferase
J. Biol. Chem. 236, 211
8. Birau, N., Schloot, W. (1981):
Melatonin: Current Status and Perspectives.
In N. Birau *Advances in the Biosciences* 29, Pergamon Press Oxford, pp. 298-
326
9. Brown, G.M., Grotta, L.J., Niles, L.P., Tsui, H.W. (1980):
Physiological Regulation of Melatonin.
Proceedings of the International Symposium on Melatonin, Bremen,
September 28.-30. 1980, Pergamon Press Oxford, pp. 25-26
10. Cardinali, D.P. (1974):
Melatonin and the Endocrine Role of the Pineal Organ.
Curr. Top. Exp. Endocrinol. 2, 107-128
11. Cardinali, D.P., Lynch, H.J., Wurtman, R.J. (1972):
Binding of Melatonin in Human and Rat Plasma Proteins.
Endocrinology 91, 1213-1218

12. Cardinali, D.P., Wurtman, R.J. (1975):
Control of Melatonin Synthesis in the Pineal Organ.
In M. D. Altschule *Frontiers of Pineal Physiology*, pp. 12-43
13. Chard, T., Martin, M., London, J. (1970):
The Separation of Antibody Bound from Free Peptide Using Ammonium-sulfate and Ethanol.
In D. E. Kirkham and W. M. Hunter *Radioimmunoassay Methods. Proceedings of the European Workshop September 1970*, pp. 257-265
14. Clementi, F., Fraschini, F., Müller, E., Zanobani, A. (1965):
The Pineal Gland and the Control of Electrolyt Balance and of Gonadotropine Secretion: Functional and Morphological Observations.
Progr. Brain. Res. 10, 583-603
15. McCord, C.P., Allen, F.P. (1917):
Evidence Associating the Pineal Gland Function with Alterations in Pigmentation.
J. Exp. Zool., 23, 207
16. Cramer, H. (1974):
On the Effects of Melatonin on Sleep and Behaviour in Man.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 11, 187-191
17. Eckert, H.G. (1976):
Die Technik des Radioimmunoassays.
Angew. Chem. 17, 88
18. Ekins, R. (1969):
Problems of Sensitivity with Special Preference to Optimal Conditions: Concentrations of Tracer and Antibody, Time and Temperature of Discubation, Volume of Incubation etc.
Proceedings of the Instructional Symposium of Proteins and Polypeptide-Hormones. In M. Margoulies, *Excerpta Medica*, Amsterdam, p. 672
19. Ekins, R., Neumann, G. (1969):
The Optimalization of Precision and Sensitivity in the RIA-Method.
In M. Margoulies, *Excerpta Medica* Amsterdam, pp. 125-127.
20. Illernova, H., Vanecek, J. (1979):
Effect of One Minute Exposure to Light and Night on Rat Pineal Serotonin N-Acetyl-Transferase and Melatonin.
J. Neurochem. 32 (2), 673-675
21. KABI AB, Stockholm:
Kit for Radioimmunoassay of Melatonin.
Description of Method (Beschreibung zum RIA-Kit)

22. Kakuichi, K., Sikai, K.K., Marks, B.H. (1972):
Adrenergic Effects on Pineal Cell Membrane Potential Life Sci., Part I,
11, 285-291
23. Kamberi, I.A., Mical, R.S., Porter, J.C. (1971):
Effects of Melatonin and Serotonin on the Release of FSH and Prolactin.
Endocrinology 88, 1288-1293
24. Kappers, J.A. (1960):
The Development, Topographical Relations and Innervations of the Epiphysis Cerebri in the Albino Rat.
J. Cell. Sci. 52, 163-215
25. Kitay, I.J., Altschule, M.D. (1954):
Effects of Pineal Extract Administration on Ovary Weight in Rats.
Endocrinology 55, 782-784.
26. Klein, D.C., Weller, J.L. (1972):
Rapid Light Induced Decrease in Pineal Serotonin-N-Acetyl-Transferase-Activity.
Science 177, 532-533
27. Krause, U. (1979):
Hormonbestimmung – Eine Übersicht über heutige Methoden.
Med. Mo. Pharm., 8, 238-241
28. Leone, R.H., Silman, R.E., Hoper, R.J.L., Preece, M.A. (1980):
Melatonin and Puberty.
Program and Abstracts of the VI. International Congress of Endocrinology, Melbourne, February 10.-16. 1980: Union Offset Company Canberra, p. 587
29. Lerner, A.B., Case, J.D., Takashi, Y., Lee, T.H., Mori, W. (1958):
Isolation of Melatonin. The Pineal Gland Factor that Lightens Melanocytes
J. Amer. Chem. Soc., 80, 2587
30. Levine, L., Riceberg, L.J. (1975):
Radioimmunoassay for Melatonin.
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 4, 636-702
31. Lewy, A.J. (1980):
Human Plasma Melatonin Studies –
Effect of Light and Implications for Biological Rhythm Research.
Proceedings of the International Symposium on Melatonin, Bremen, September 28.-30. 1980, Pergamon Press Oxford, pp. 167-168.
32. Lynch, H.J., Eng, J.P., Wurtman, R.J. (1973):
Control of Pineal Indole Biosynthesis by Changes in Sympathetic Tone Caused by Factors Other than Environmental Lighting.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 70, 1704-1707

33. Matthews, C.C., Kennaway, D.J., Frith, R.G., Phillipou, G., Le Cornu, A., Seamark, R.F. (1977):
Plasma Melatonin Values in Man and Some Domestic Animals.
J. Endocr., 73, 41-42
34. Methews, C.D. (1980):
Clinical Endocrinology of Melatonin
Proceedings of the International Symposium on Melatonin, Bremen,
September 28.-30. 1980, Pergamon Press Oxford, pp. 57-60
35. Midgley, A.R., Niswender, G.D., Rebar, R.W. (1969):
Principles for the Assessment of the Reliability of Radioimmunoassay
Methods. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive
Endocrinology.
Proceedings of the I. Symposium of Immunoassay of Gonadotropines,
Stockholm, September 23.-25. 1980.
36. Moore, D.C., Paunier, L., Sizonenko, P.C. (1979):
Effect of Adrenergic Stimulation and Blockade on Melatonin Secretion in the
Human.
Acta Endocr. (Kbh.) 225, 238
37. Mullen, P.E., Linsell, C., Silman, R.E., Edwards, R., Carter, S., Hooper, J., Leone, R., Laude, C., Smith, J., Towell, P. (1978):
The Human Pineal - New Approaches and Prospects.
J. Psychosom. Res. 22, 357-376.
38. Nagle, C.A., Cardinali, D.P., Rosner, J.M. (1974):
Effects of Castration and Testosterone Administration on Pineal Hydroxy-
Indole-O-Methyltransferase.
Neuroendocrinology 14, 14-23.
39. Nagle, C.A., Neuspiller, N.R., Cardinali, D.P., Rosner, J.M. (1972):
Uptake and Effect of 17-Beta-Estradiol on Pineal Hydroxy-Indol-O-Methyl-
transferase (HIOMT)-Activity.
Life Sci., Part 2, 11, 1109-1116
40. Nicoll, C.S., Fiorindo, R.P. (1969):
Hypothalamic Control of Prolactin Secretion.
Gen. Comp. Endocrinol. 26, 85-87.
41. Nir, J. (1970):
Changes in the Electrical Activity of the Brain Following Pinealektomie.
Life Sci., Part 1, 9, 851-858
42. Ozaki, Y., Lynch, H.J., Wurtman, R.J. (1976):
Melatonin in Rat Pineal, Plasma and Urine: 24-Hour-Rhythmicity and Effect
of Chlorpromazine.
Endocrinology 98, 1418-1428

43. Pang, S.F., Ralph, C.L. (1975): Mode of Secretion of Pineal Melatonin in the Chicken.
Gen. Comp. Endocrinol. 27, 125
44. Raikhlin, N., Kretnay, J., Tolkacher, V. (1975):
Melatonin may be Synthesized in Endochromaffin Cells.
Nature 225, 344-345
45. Ralph, C.L. (1970):
Structure and Allied Function of Avian Pineals.
Amer. Zool. 10, 217-235
46. Ralph, C.L., Mull, D., Lynch, H.J., Hedlund, L. (1971):
A Melatonin Rhythm Persists in Rat Pineal in Darkness.
Endocrinology 89, 1361-1366
47. Reuter, A. (1975):
Quality Control of RIA.
Proceedings of the RIA-Workshop, University of Gent,
Belgium, April 14.-15. 1975
48. Rick, W. (1976):
Klinische Chemie und Mikroskopie.
Springer, Berlin
49. Rivest, R.W., Wurtman, R.J. (1980):
New Trends and Perspectives in Melatonin Research.
Proceedings of the International Symposium on Melatonin, Bremen,
September 28.-30. 1980, Pergamon Press Oxford, pp. 67-70.
50. Rodbord, D., Rayford, P.L., Cooper, J.A., Ross, G.F. (1968):
Statistical Quality Control of Radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1412
51. Rollag, M.D., Niswender, G.D. (1976):
Radioimmunoassay of Serum Concentrations of Melatonin in Sheep Exposed to Different Lighting Regimens.
Endocrinology 98, 482-489
52. Sizonenko, P.C., Lenko, H.L., Lang, V., Aubert, M.L., Paunier, L. (1980):
Melatonin in Pediatrics.
Proceedings of the International Symposium on Melatonin, Bremen,
September 28.-30. 1980, Pergamon Press Oxford, pp. 61-63.
53. Skelly, D., Brown, L., Besch, P. (1973):
Standardization of RIA-Procedures.
Clin. Chem. 19, 146

54. Smith, J., Mullen, P.E., Silman, R.E., Snedden, W., Wilson, B.W. (1976):
Absolute Identification of Melatonin in Human Plasma and Cerebrospinal
Fluid.
Nature 260, 718-719
55. Taylor, A.N., Wilson, R.W. (1970):
Electrophysiological Evidence for the Action of Light and the Pineal Gland in
the Rat.
Experientia 26, 267-270
56. Tharandt, L., Reinwein, D. (1983):
Melatonin, ein klinisch bedeutsames Hormon.
Dtsch. Med. Wochenschr. 108 (12): 470-473
57. Tomatis, M.E., Oviatt, R. (1967):
Changes in Melatonin Concentration in Pineal Gland of Rats Exposed to
Continuous Light and Darkness.
Acta Physiol. Lat. Amer. 17, 227-233.
58. Vaughan, G.M., Pelham, R.W., Pang, S.F., Laughlin, L.L., Wilson, K.M.,
Sandock, K.L., Vaughan, M.K., Koslow, S.H., Russel, J.R. (1976):
Nocturnal Elevation of Plasma Melatonin and Urinary 5-Hydroxyindole-
Acetic-Acid in Young Man. Attempts at Modification by Brief Changes in
Environmental Light and Sleep and by Autonomic Drugs.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42 (4), 752-764.
59. Vlahakes, G., Wurtman, R.J. (1972):
A 2^+ Mg - Dependant Hydroxy-Indole-O-Methyl-Transferase in Rat Harde-
rian Gland.
Biochem. Biophys. Acta 261, 193-197
60. Waldeyer, A. (1973):
Anatomie des Menschen, 2. Teil, 10. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, 335
61. Weiss, B., Crayton, J. (1970):
Gonadal Hormones and Regulators of Pineal Adenyl-Cyclase Activity.
Endocrinology 87, 527-533
62. Wetterberg, L. (1978):
Melatonin in Humans.
J. of Neural Transmission 13, 289-310
63. Wetterberg, L. (1979):
Clinical Importance of Melatonin.
Progr. Brain Res. 52, 539-547.
64. Wetterberg, L., Arendt, J. (1975):
Melatonin and the Menstrual Cycle.
The Lancet, 30. August 1975, 417

65. Wetterberg, L., Eriksson, O., Friberg, Y., Vangbo, B. (1978):
A Simplified Radioimmunoassay for Melatonin and its Application to Biological Fluids.
Clin. Chim. Acta 86, 169-177
66. Wide, L. (1970):
Solid Phase Antigen-Antibody-Systems.
In D.E. Kirkham and W.M. Hunter Radioimmunoassay Methods.
Proceedings of the European Workshop, September 1970, pp. 405-413
67. Willig, R.P., Comments, J.C., Stahnke, N. (1980):
Determination of Diurnal Melatonin Plasma Levels in Children with Turner Syndrome Using a New Antiserum.
Proceedings of the International Symposium on Melatonin, Bremen, September 28.-30. 1980, Pergamon Press Oxford, pp. 185-186.
68. Willig, R.P., Schröder, C. (1981):
Melatonin Secretory Dynamics in Normal Children and Various Diseases.
Rapid Communication, by J. Clin. Endocrinol. Metab. eingereicht.
69. Wurtman, R.J. (1963):
Melatonin Synthesis in the Pineal Gland Controlled by Light.
Science 142, 1071-1073
70. Wurtman, R.J. (1967):
Effects of Light and Visual Stimuli of Endocrine Function.
Neuroendocrinology 2, 19-59
71. Wurtman, R.J., Anton-Tay, F. (1969):
The Mammalian Pineal as a Neuroendocrine Transducer.
Recent Prog. Horm. Res., 25, 493-522
72. Wurtman, R.J., Axelrod, J. (1965):
The Pineal Gland.
Sci. Amer. 213, 50-59.
73. Wurtman, R.J., Axelrod, J., Sedvall, G., Moore, R.Y. (1967):
Photic and Neural Control of the 24-Hours-Norepinephrine Rhythm in the Rat Pineal Gland.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 157, 487-492
74. Wurtman, R.J., Axelrod, J., Synder, S.H., Chu, E.W. (1965):
Changes in the Enzymatic Synthesis of Melatonin in the Pineal During the Estrous Cycle.
Endocrinology 76, 798-800
75. Wurtman, R.J., Cardinali, D.P. (1974):
The Pineal Organ.
In R. Williams Textbook of Endocrinology, 5th Edition, Saunders Philadelphia, pp. 832-840.

76. Wurtman, R.J., Kammer, H. (1966):
Melatonin Synthesis by an Ectopic Pinealoma.
New Engl. J. Med. 274 (22), 1233-1237
77. Wurtman, R.J., Moskowitz, M.A. (1977):
The Pineal Organ, Part 1.
New Engl. J. Med. 296 (23), 1329-1333
78. Wurtman, R.J., Moskowitz, M.A. (1977):
The Pineal Organ, Part 2.
New Engl. J. Med. 296 (24), 1383-1386
79. Yalow, R.S., Berson, S.A. (1959):
Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods.
Nature 184, 1648
80. Yalow, R.S., Berson, S.A. (1960):
Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man.
J. Clin. Invest., 39, 1157

X. ANHANG

1. Tabellen

Tabelle I Daten von 18 Radioimmunoassays von Melatonin

Assay-Nr.	Gesamt aktivität GA [cpm]	Leerwert P [% v.GA]	spez. Bindung B ₀ [% v.GA]	Bindung in % von B ₀ bei Standardhormonkonzentration von	500 ng/l	1000 ng/l	2000 ng/l
				125 ng/l	250 ng/l	500 ng/l	1000 ng/l
1.	1.693	7,7	27,0	85,2	73,2	48,6	33,2
2.	1.657	9,3	27,0	86,2	51,6	32,5	21,1
3.	1.550	7,0	40,3	83,3	44,2	24,7	12,7
4.	1.289	10,6	35,1	86,5	71,0	37,4	31,7
5.	1.523	9,2	39,4	87,6	65,2	45,9	28,7
6.	1.597	7,96	35,1	77,0	53,7	41,6	27,8
7.	1.611	7,68	36,6	87,5	64,5	46,0	29,0
8.	1.681	6,14	16,1	91,0	78,0	50,0	35,0
9.	1.693	2,4	29,0	94,4	76,3	46,7	30,0
10.	1.527	9,2	41,1	87,3	66,9	41,8	25,5
11.	1.545	8,94	39,2	93,0	62,8	44,3	28,8
12.	1.594	8,37	43,6	87,6	74,8	41,7	27,2
13.	1.619	7,64	40,2	88,3	74,8	39,9	28,1
14.	1.347	10,27	35,5	86,6	55,3	48,3	26,8
15.	1.528	8,75	40,9	67,6	58,9	33,2	24,7
16.	1.689	7,12	39,27	87,8	64,1	43,3	28,1
17.	1.607	9,05	35,9	94,4	56,5	44,8	25,4
18.	1.712	9,84	37,6	99,1	82,5	44,7	24,9
$\bar{x}$	1.580	8,27	35,5	87,2	61,7	41,9	27,1
S	111	1,86	6,78	6,88	11,5	6,48	4,85
V [%]	7,06	22,5	19,0	7,8	15,1	15,4	17,8
							19,2

Tabelle II Intraassay-Varianz und „kalte“ Recovery durch Bestimmung einer Serumprobe mit Zusatz einer bekannten Konzentration unmarkierten Hormons

Methode nach Wetterberg et al. (65):

Melatonin- konzentration [ng/l]	Poolserum einfach		Poolserum mit Melatoninstandard 125 ng/l											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
17	123	289	227	217	164	221	181	306	115	91	121	179	157	

$\bar{x} = 176 \text{ ng/l}$
 $s = 67 \text{ ng/l}$
 Intraassay-Varianz $V = 38,5 \%$
 „kalte“ Recovery = 140,8 %

Methode nach Arendt et al. (5):

Melatonin- konzentration [ng/l]	Poolserum einfach		Poolserum mit Melatoninstandard 125 ng/l			
	1	2	3	4	5	
Ø	9,32	20,4	16	14,2	12,1	

$\bar{x} = 14,4 \text{ ng/l}$
 $s = 67 \text{ ng/l}$
 Intraassay-Varianz $V = 29 \%$
 „kalte“ Recovery = 11,5 %

Methode teils nach Arendt (5), teils nach Wetterberg (65):

Melatonin- konzentration [ng/l]	Poolserum einfach	Poolserum mit Melatoninstandard 125 ng/l														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ø 4		57	47	89	69	94	91	81	80	64	44	75	60	60	79	92
		117	84	85	96	104	77	85	119	76	85	121	125	130	125	98

$\bar{x} = 72$ ng/l bzw. 101 ng/l
 $s = 16$ ng/l bzw. 19 ng/l
 Intraassay-Varianz $V = 22$ % bzw. 19 %
 „kalte“ Recovery = 69,2 %

Melatonin- konzentration [ng/l]	Poolserum einfach	Poolserum mit Melatoninstandard 250 ng/l													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
26		218	302	239	96	100	245	248	68	157	285	249	274	293	

$\bar{x} = 219$ ng/l
 $s = 74$ ng/l
 Intraassay-Varianz $V = 33$ %
 „kalte“ Recovery = 87,6 %

Tabelle III: Interassay-Varianz: Wiederholte Bestimmung des Referenzserums mit einem Sollwert von 200 ng/l

Methode nach Wetterberg et al. (65):

Versuchs-Nr.:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
150		210	151	151	171	180	272	182	228	150	182
Qualitätskontrollen:											
										$\bar{x}$ = 187	ng/l
										s = 39	ng/l
										Interassay-Varianz V = 20	%
										„kalte Recovery“ = 102,5	%

Methode teils nach Arendt (5), teils nach Wetterberg (65):

Versuchs-Nr.:		1	2	3	4	5	6	7	8
176		331	217	217	171	180	272	182	228
Qualitätskontrollen:									
								$\bar{x}$ = 205	ng/l
								s = 53	ng/l
								Interassay-Varianz V = 26	%
								„kalte Recovery“ = 102,5	%

Tabelle IV: Inkubationskinetik über 1-8 Stunden (Versuch I)
mit Proben der spezifischen Bindung B_o in % der Gesamtaktivität $GA = 1.527$ cpm

Versuchsgruppe	Zeit t [min]																$\left[\frac{B_o}{GA} \times 100 \right]$	
	05'	10'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'	180'	240'	300'	360'	420'	480'		
1. Gruppe: 4°C	42	50	49	51	50	50	52	52	51	48	49	47	49	51	48	38		
2. Gruppe: 20°C	46	47	50	38	45	49	58	57	47	46	47	42	44	45	45	47		
3. Gruppe: 37°C	42	39	43	45	44	43												

Inkubationskinetik über 2 Stunden (Versuch II)
mit Proben der spezifischen Bindung B_o in % der Gesamtaktivität $GA = 1.575$ cpm

Versuchsgruppe	Zeit t [min]																$\left[\frac{B_o}{GA} \times 100 \right]$	
	05'	10'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'								
1. Gruppe: 37°C	44	45	37	46	46	51	42	45	34	48								
2. Gruppe: 4°C	42	49	39	48	49	50	48	48	47	50								

Tabelle V: Sensitivität der radioimmunologischen Bestimmungsmethode

Versuchs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
kleinste zu bestimmende Hormonkonzentration [ng/l]	74	14	45	27	35	50	45	14	120	12	16	41	11	29

Mittelwert $\bar{x} = 38$

[ng/l]

Standardabw. $s = 29,7$

Variationskoeff. $V = 78\%$

Tabelle VI: Vergleich zwischen KABI-Antikörper und Arendt-Antikörper (4) anhand einer Inkubationskinetik über 3 Stunden mit Proben der spezifischen Bindung B_0 [% von GA]; Gesamtaktivität GA = 1.591 cpm

Antikörper	spez. Bindung B_0 bei verschiedenen Inkubationszeiten [min]									
	10'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'	180'
Arendt-AK	21,7	21,4	21,3	17,5	14,8	21,7	20,8	18,8	19,0	21,0
KABI-AK K244	39,5	40,8	38,2	43,1	42,0	41,9	44,0	33,6	43,5	42,0

Tabelle VII: Vergleich zwischen KABI-Antikörper K244 und Arendt-Antikörper (4) anhand von Melatoninstandardkurven

Antikörper	spez. Bindung B ₀ in % v. GA	Standardwerte in % von B ₀ bei unterschiedlichen Melatoninstandardkonzentrationen					
		62,5 ng/l	125 ng/l	250 ng/l	500 ng/l	1000 ng/l	2000 ng/l
Arendt-AK	24	89,53	87,48	74,44	60,62	52,28	43,71
KABI-AK 244	40	85,60	76,18	60,80	40,80	26,80	13,69

Tabelle VIII: Vergleich zwischen KABI-Antikörper K244 und Arendt-Antikörper (4) anhand von Serummelatoninbestimmungen unter LHRH-Hypophysenbelastungstest

Antikörper	Serummelatoninkonzentration [ng/l] zu verschiedenen Entnahmezeiten [min]							
Arendt-AK	- 30'	0'	30'	60'	90'	120'		
	450	122	211	40	91	73		
KABI-AK K244	5,6	13,8	5,3	6,3	8,5	neg. außerhalb d. Bereiches		

Tabelle IX: „Heiße“ Recovery in % der Gesamtaktivität

radioimmunol.

Bestimmungsmethode

radioimmunol. Bestimmungsmethode	Versuchs-Nr.:							Qualitätskontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	$\bar{x}$	s	V [%]
Methode nach Wetterberg et al. (65)	55	35,5	44,7	72	50,2			51,5	13,5	26,2
Methode nach Arendt et al. (5)	82*	93	89**							
Methode teils nach Wetterberg, teils nach Arendt	73	57	63	70	71	68,7	82	69,2	7,8	11,3

* mit 0,5% Jodacetamid

**** ohne Petroleumäther**

Tabelle X: Trennungungsverfahren – Ammoniumsulfat, Doppelantikörper, Aktivkohle – anhand von Werten der Melatoninstandardkurve und des Referenzserums (Sollwert 200 ng/l)

Probe	Ammoniumsulfat	Doppelantikörper	Aktivkohle
nichtspez. Bindung P [% von GA]	8,07	7,4	2,4
spez. Bindung B ₀ [% von GA]	36,0	26,9	3,46
Standard 62,5 ng/l [% von B ₀]	85,6	78,6	68,6
Standard 125 ng/l [% von B ₀]	76,1	67,3	90,5
Standard 250 ng/l [% von B ₀]	60,8	55,5	81,5
Standard 500 ng/l [% von B ₀]	40,8	35,9	43,5
Standard 1000 ng/l [% von B ₀]	26,8	27,3	21,7
Referenzserum 200 ng/l ≡ „kalte“ Recovery [% von 200 ng/l]	93,5	80,0	

Tabelle XI: Qualitätskontrollen für die radioimmunologische Bestimmung nach Wetterberg et al. (21) mit dem KABI-Antikörper K244

	eigene Ergebnisse	Ergebnisse v. L. Wetterberg et al. (65)
Richtigkeit	93,5 %	96 %
Präzision:		
a) Intraassay-Varianz	38 %	7 %
b) Interassay-Varianz	20 %	13,5 %
„kalte“ Recovery	93,5 %	96 %
„heiße“ Recovery	51,5 %	80 %
unspez. Bindung	8-10 %	10 %
spez. Bindung	30-40 %	30-40 %

Tabelle XII: Haltbarkeitsversuche

Tracer, Melatoninstandard 1000 ng/l, Referenzserum und Antikörper vom 07.05.1978 werden an den beiden folgenden Versuchstagen bestimmt: 07.05.1978 und 21.05.1978

Probe	07.05.1978	21.05.1978
Tracer	1.666 cpm	1.779 cpm
Standard 1000 ng/l	211 cpm	345 cpm
Antikörper	766 cpm	745 cpm
Referenzserum aufgelöst und bei Kühlschranktemp. aufbewahrt	140 ng/l	89 ng/l

Tabelle XIII: Melatonin- und LH-Serumkonzentrationen bei vier Probanden während drei Versuchsnächten unter LHRH-Gabe und Schlafmittelgabe

Zeit [h]	Melatoninkonzentration [ng/l]			LH [mE/ml]
	1. V. o. Ph.	2. Phaenemal	3. LHRH-Test	
Proband A.				
20.00	17,86	71,80	30,70	21,40
22.00	35,73	25,35	37,51	54,70
24.00	66,65	59,85	19,61	76,70
2.00	63,70	55,25	38,44	74,80
4.00	44,43	27,00	29,24	54,90
6.00	43,48	52,34	17,01	37,40
8.00	neg.a.Ber.	13,00	12,89	26,60
Proband B.				
20.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	26,10
22.00	13,33	14,74	neg.a.Ber.	129,00
24.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	94,50
2.00	21,11	31,67	8,11	96,70
4.00	16,25	73,72	17,01	86,10
6.00	4,79	34,40	16,50	49,90
8.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	30,80
Proband C.				
20.00	neg.a.Ber.	7,94	neg.a.Ber.	23,80
22.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	8,96	112,40
24.00	neg.a.Ber.	6,65	12,44	153,40
2.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	138,50
4.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	169,10
6.00	neg.a.Ber.	8,96	neg.a.Ber.	111,80
8.00	neg.a.Ber.	10,95	neg.a.Ber.	88,00
Proband D.				
20.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	11,50
22.00	neg.a.Ber.	4,20	neg.a.Ber.	157,80
24.00	13,74	19,74	12,14	303,30
2.00	30,19	15,35	7,95	234,42
4.00	20,29	15,94	neg.a.Ber.	91,50
6.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	49,70
8.00	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	neg.a.Ber.	30,70

neg.a.Ber.

≙ negativ außerhalb des Meßbereiches

V.o.Ph.

≙ Versuchsnacht ohne Pharmakon

Tabelle XIV: Melatoninausscheidung im Urin bei vier Probanden

Urinprobe	Serummaxi- malwert [ng/l]	Melatonin- konz. [ng/12 h]	Kreatinin- konz. [g/12 h]	Mel.Krea. Quotient [ng/g]	Urinmenge [ml/12 h]
Proband A.					
Tagesurin 6.3.		37,10	0,90	41	700
V.o.Ph. 6./7.3.	66,00	42,00	0,83	50	500
Tagesurin 5.3.		28,80	0,90	32	1.600
Phaenemal 5./6.3.	60,00	23,80	0,17	140	250
Tagesurin 7.3.		11,10	0,75	14	600
LHRH-Test 7./8.3.	38,00	26,40	0,50	52	300
Tagesurin 8.3.		63,90	0,66	96	900
Proband B.					
Tagesurin 12.2.		17,00	0,63	26	1.500
V.o.Ph. 12./13.2.	21,00	24,10	0,52	46	650
Tagesurin 13.2.		27,22	0,86	31	1.650
Phaenemal 13./14.2.	73,70	53,50	0,67	80	1.600
Tagesurin 14.2.		50,75	0,58	87	2.500
LHRH-Test 14./15.2.	17,00	neg.a.Ber.	0,82	-	400
Tagesurin 15.2.		14,13	0,98	14	1.000
Proband C.					
Tagesurin 5.2.		neg.a.Ber.	0,50	-	800
V.o.Ph. 5./6.2.	neg.a.Ber.	9,70	0,68	14	900
Tagesurin		3,90	0,85	4,5	700
Phaenemal 6./7.2.	10,90	13,10	0,92	14	650
Tagesurin 7.2.		26,30	0,90	29	800
LHRH-Test 7./8.2.	12,00	23,90	0,60	39	600
Tagesurin 8.2.		24,40	0,79	30	650
Proband D.					
Tagesurin 30.1.		2,60	0,77	3	600
V.o.Ph. 31.1	30,00	neg.a.Ber.	0,75	-	500
Tagesurin 29.1		neg.a.Ber.	0,69	-	1.100
Phaenemal 29./30.1.	16,00	10,50	0,48	22	500
Tagesurin 31.1.		neg.a.Ber.	0,80	-	1.100
LHRH-Test 7./8.3.	12,00	4,00	0,63	-	400
Tagesurin 1.2.		neg.a.Ber.	0,54	-	600

2. Beschreibung der Probanden

Klinische und laborchemische Daten, Begleitmedikation, Allgemeinbefinden und Schlafverhalten der Probanden

A.: Geschlecht: männlich

Alter: 50 Jahre

Gewicht: 62 kg

Größe: 172 cm

nächtliches Verhalten: in allen drei Versuchsnächten geschlafen
jeweils von 22.00 bis 6.00 Uhr

Labor: 1. Blutzucker 5./6.3.: 20.00 = 198 mg %

21.00 = 280 mg %

24.00 = 144 mg %

2. Fette: Triglyceride = 115 mg %

Cholesterin = 101 mg %

Medikamente: keine

LHRH-Infusionsdauer während der LHRH-Belastungstests: 6,5 Std.

Dosierung: LHRH 1 µg/kg KG/Std. = 403 µg/6,5 Std.

B.: Geschlecht: männlich

Alter: 45 Jahre

Gewicht: 77,8 kg

Größe: 176 cm

nächtliches Verhalten: geschlafen: 12./13.2. von 22.30 bis 6.00 Uhr (V.o.Ph.*)

13./14.2. nicht gut geschlafen (Phenaemal)

14./15.2. von 23.00 bis 6.00 (LHRH)

Labor: 1. Blutzucker 12./13.2. (NNB) von 22.00 bis 1.00 Uhr

= 25-30 mg %, gegen 24.00 Uhr = 40 mg %

2. Fette: Triglyceride = 447 mg %

Cholesterin = 266 mg %

3. Urinstatus = Bakterien

Medikamente: bis zum Aufnahmetag 2 x 1 Sedaliquid } während
2 x 1 Sermion } 2 Wochen

Anamnese: Alkoholabusus (2 Fl. Wein/Tag)

LHRH-Infusionsdauer = 6,5 Std. $\triangleq$ 500 µg/6,5 Std.

C.: Geschlecht: männlich

Alter: 56 Jahre

Gewicht: 105 kg

Größe: 182 cm

* V.o.Ph. = Versuchsnacht ohne Pharmakon

Übergewichtigkeit von 42 % nach dem Broca-Index

nächtliches Verhalten: nicht gut geschlafen, unruhig, häufig aufgewacht:

5./6.2.: 24.00 bis 6.00 Uhr

(V.o.Ph.)

6./7.2.: 23.00 bis 5.00 Uhr

(Phenaemal) – wach von

0.30 bis 1.30. Uhr

7./8.2.: 24.00 bis 8.00 Uhr (LHRH)

Labor: 1. Blutzucker 6.2.: 11.00 Uhr = 149 mg %

14.00 Uhr = 209 mg %

2. Fette: Triglyceride = 410 mg %

Cholesterin = 168 mg %

Medikamente: 2 x 1 Aldactone

3 x 1 Novodigal

Anamnese und Klinik: Polyneuropathie

LHRH-Infusionsdauer = 6,5 Std. $\triangleq$ 676 μ g/6,5 Std.

D.: Geschlecht: weiblich

Alter: 23 Jahre

Gewicht: 64 kg

Größe: 173 cm

nächtliches Verhalten: gut geschlafen:

29./30.1.: 22.00 bis 6.00 Uhr (Phenaemal)

30./31.1.: 22.30 bis 6.30 Uhr (V.o.Ph.)

31.1./1.2.: 22.00 bis 6.00 Uhr (LHRH)

– Probandin klagt über Übelkeit

Labor: 1. Blutzucker nächtliche Werte: 218 mg %, 271 mg %, 219 mg %

2. Fette: Triglyceride = 122 mg %

Cholesterin = 166 mg %

Medikamente: keine

Tag der letzten Menstruation: 15.1.

Anamnese: unauffällig

LHRH-Infusionsdauer 6,5 $\triangleq$ 384 μ g/6,5 Std.

3. Verzeichnis der Abkürzungen

ACTH	- Adrenocorticotropes Hormon
Ag	- Antigen
Ak	- Antikörper
B ₀	- spezifische Bindung
Ci	- Curi = Maßeinheit der Radioaktivität 1 μ Ci $\hat{=}$ 37 K Bq (Bq = Becquerel)
cpm	- counts per minute
CSF	- Cerebrospinalflüssigkeit
cyclo-AMP	- cyclo-Adenosin-3',5'-monophosphat
ECT	- Elektrokonvulsivtherapie
FRF	- Follikel-stimulierendes Hormon - Releasing Faktor
FSH	- Follikel-stimulierendes Hormon
GA	- Gesamtaktivität
GC	- Gaschromatographie
HIOMT	- Hydroxy-Indol-O-Methyltransferase
LH	- Luteinisierendes Hormon
LHRH	- Luteinisierendes Hormon - Releasing Hormon
log	- Logarithmus
logit-log	- Definition siehe Kap. IV. 2., S. 36
MAO	- Monoaminoxidase
MS	- Massenspektrometrie
MSH	- Melanocyten-stimulierendes Hormon
NADPH	- Nicotinamid-Dinucleotid - Phosphat-Wasserstoff
neg.a.Ber.	- negativ, außerhalb des Meßbereiches
NU	- Nachturin
P	- Leerwert
PIF	- Prolactin Inhibiting Faktor
pos.a.Ber.	- positiv, außerhalb des Meßbereichs
PRF	- Prolactin Releasing Faktor
rad	- radiation - absorbed-dose = Einheit für die absorbierte Strahlendosis
REM	- Rapid Eye Movement
RIA	- Radioimmunoassay
RNA	- engl.: Ribo-Nucleic-Acid = Ribonucleinsäure
rpm	- rounds per minute
s	- Standardabweichung
STH	- Somatotropes Hormon
TRH	- Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	- Thyreotropin
TU	- Tagesurin
V	- Variationskoeffizient
V.o.Ph.	- Versuchsnacht ohne Pharmakon

LEBENS LAUF

LEBENS LAUF

Am 22. November 1954 wurde ich, Daniela Diehl, geb. Rahm, Tochter von Ludwig Rahm und seiner Frau Gisela Rahm, geb. Hahn, in Berlin-Wilmersdorf geboren.

- 01.04.1961 Eintritt in die Ruppiner-Grundschule in Berlin-Schöneberg
- 01.04.1967 Wechsel in das Paul-Natorp-Gymnasium in Berlin-Schöneberg
- 25.11.1971 Tod meines Vaters an einem Gehirntumor, Klinikum Steglitz, Berlin
- 03.12.1973 Abitur am Paul-Natorp-Gymnasium abgelegt
- 01.04.1974 Beginn des Medizinstudiums an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
- 26.03.1976 Ärztliche Vorprüfung an der Universität Mainz
- 21.03.1977 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Universität Mainz
- 21.08.1979 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Universität Mainz
- 1979/1980 Praktisches Ausbildungsjahr im Stadtkrankenhaus Worms, Lehrkrankenhaus der Universität Mainz
- 07.10.1980 Dritter Teil der ärztlichen Prüfung an der Universität Mainz
- 27.10.1980 Mündlicher Teil des Dritten Staatsexamens am Lehrkrankenhaus Worms

Seit

Februar 1981 als Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik des Kreiskrankenhauses Groß-Umstadt tätig

- 11.01.1983 Eheschließung mit Erich Diehl aus Groß-Umstadt
- 08.03.1983 Geburt der Tochter Sandra
- 05.01.1986 Geburt des Sohnes Marcel

Groß-Umstadt, den 15. Mai 1986

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die im Fachbereich Humanmedizin Mainz zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel

„Untersuchungen zum Einfluß von LHRH auf die Epiphysenfunktion“

an der Abteilung für Endokrinologie der II. Medizinischen Klinik der Johannes-Gutenberg-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Beyer und mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. J. Happ und Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Krause ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung der Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Disseration vorgelegt.

Groß-Umstadt, den 15. Mai 1986

Herrn Prof. Dr. Beyer, Leiter der Abteilung für Endokrinologie der II. Medizinischen Klinik der Johannes-Gutenberg-Universität danke ich für die gewährte Arbeitsmöglichkeit in seiner Abteilung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Happ für die Überlassung des Themas und für seine umfangreiche Unterstützung bei dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich vielmals bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Krause bedanken, dessen Hilfe und Unterstützung insbesondere zu den Vorbereitungen und Diskussionen zu den Laborarbeiten wesentlich für das Gelingen der Arbeit waren.

Ebenso danke ich vielmals Frau Hirzel für die hilfreiche Gestaltung der Abbildungen.

